

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003220

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-041994
Filing date: 18 February 2004 (18.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21. 4. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 1 8 日
Date of Application:

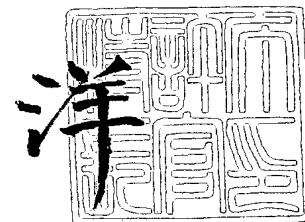
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 4 1 9 9 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 4 1 9 9 4]

出 願 人 独立行政法人科学技術振興機構
Applicant(s): 国立大学法人 鹿児島大学

2 0 0 5 年 1 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P028P08
【提出日】 平成16年 2月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07C211/00
C07K 1/107

【発明者】
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市下伊敷 1 - 1 3 - 1 - 1 0 6
【氏名】 隅田 泰生

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【特許出願人】
【識別番号】 391012523
【氏名又は名称】 鹿児島大学長

【代理人】
【識別番号】 100080034
【弁理士】
【氏名又は名称】 原 謙三
【電話番号】 06-6351-4384
【持分の割合】 50/100
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 003229
【納付金額】 10,500円

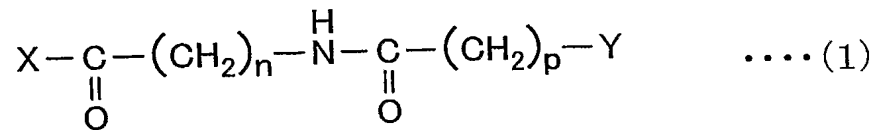
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316432

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

一般式 (1)

【化 1】



(式中、 n , p は 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備え、

上記 X として、末端に芳香族アミノ基を有するとともに、主鎖に炭素-窒素結合を有し、いてもよい炭化水素誘導鎖を、2 鎖又は 3 鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備え、上記 Y として、硫黄原子を含む炭化水素構造を備えているリンカー化合物と、還元末端を有する糖とが、上記芳香族アミノ基を介して結合している構造を有していることを特徴とするリガンド。

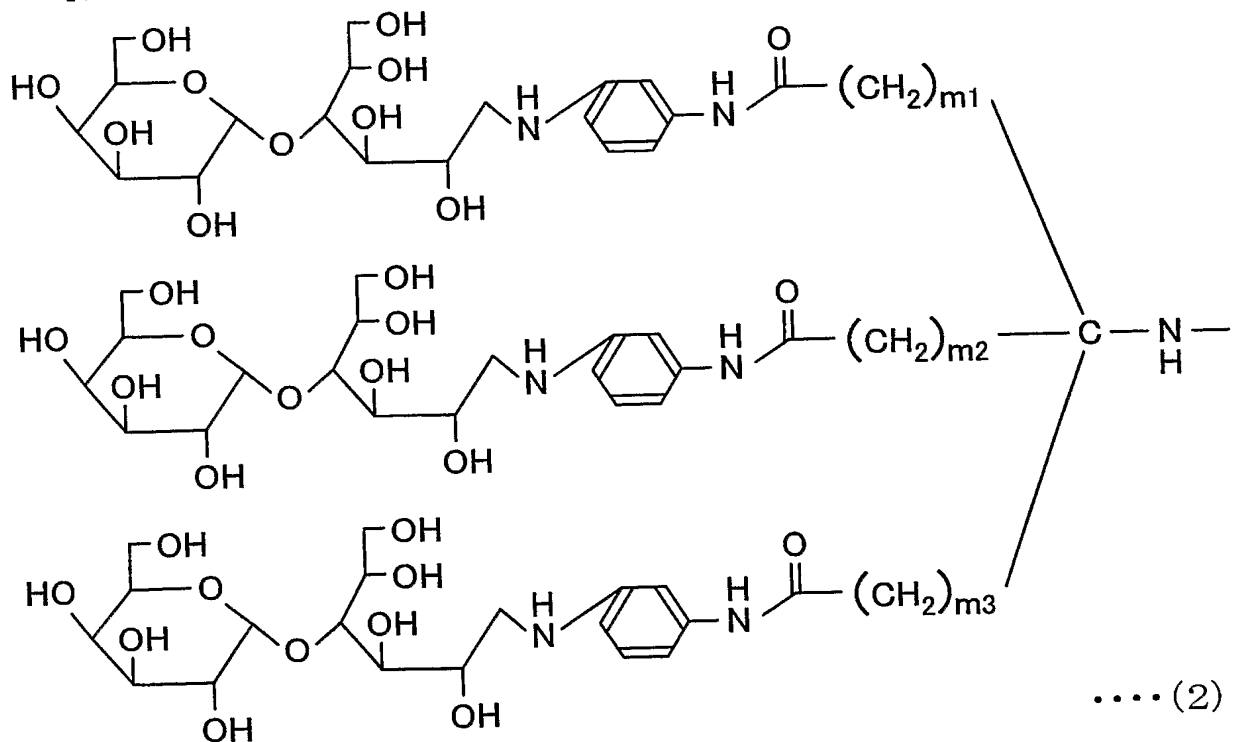
【請求項 2】

上記 Y は、S-S 結合または S-H 基を含む炭化水素構造であることを特徴とする請求項 1 に記載のリガンド。

【請求項 3】

上記 X は、一般式 (2)

【化 2】

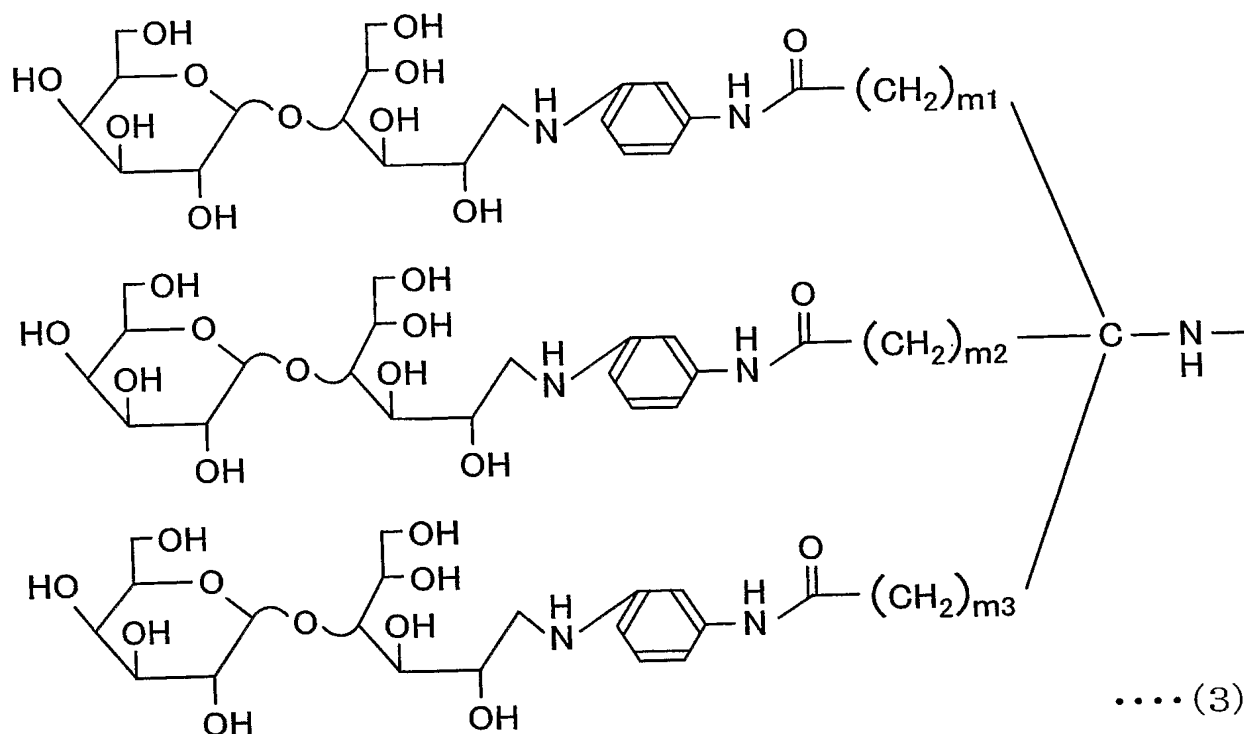


(式中、 m^1 , m^2 , m^3 はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

【請求項 4】

上記 X は、一般式 (3)

【化3】

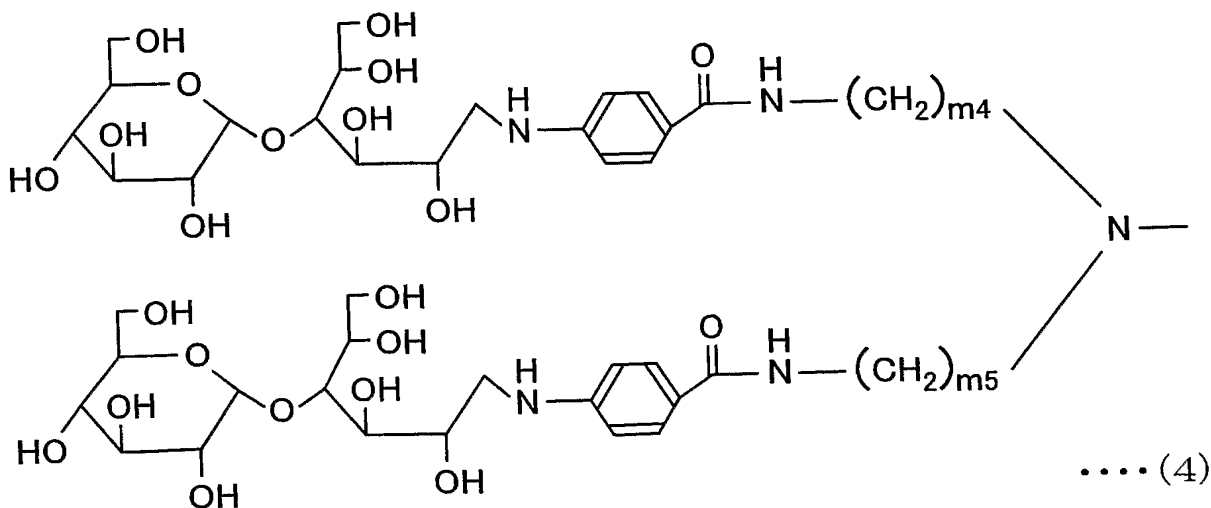


(式中、 m^1 , m^2 , m^3 はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

【請求項 5】

上記 X は、一般式 (4)

【化 4】

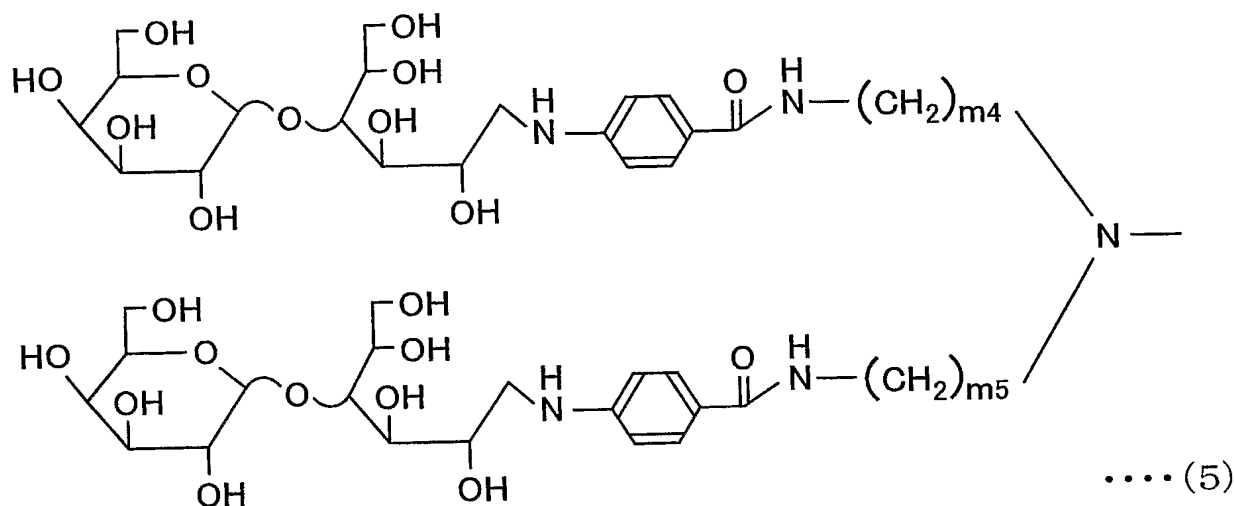


(式中、 m^4 , m^5 はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

【請求項 6】

上記 X は、一般式 (5)

【化5】

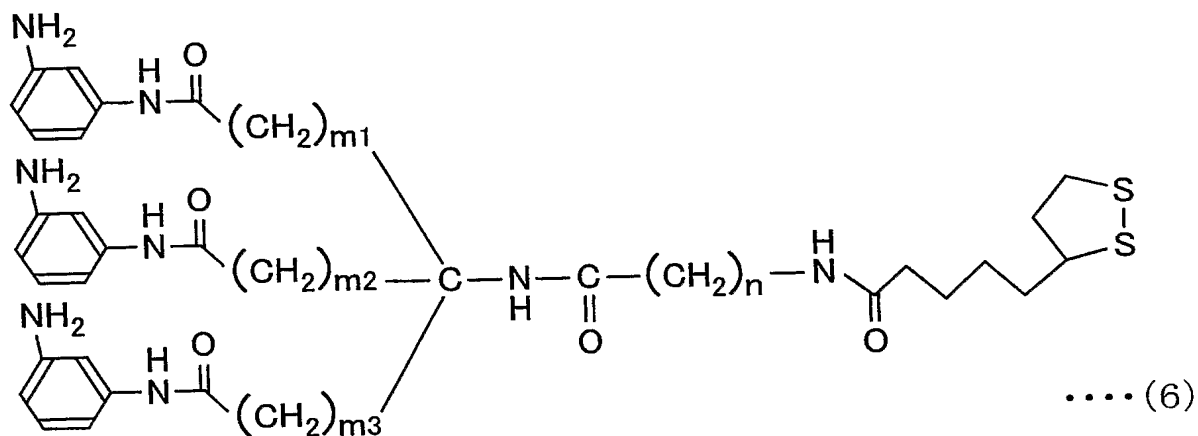


(式中、 m^4 、 m^5 は、それぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

【請求項 7】

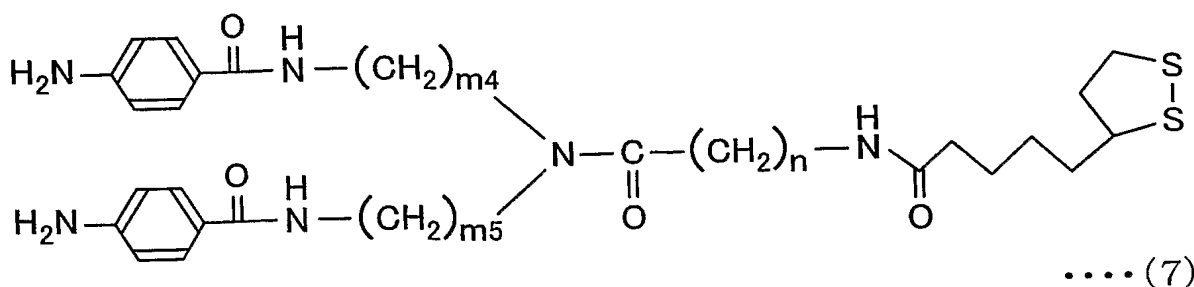
一般式 (6)

【化 6】



(式中、 m^1 、 m^2 、 m^3 、 n は 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えているリンカー化合物、または、一般式 (7)

【化 7】



(式中、 m^4 、 m^5 、 n は 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えているリンカー化合物と、
還元末端を有する糖とを用いて還元アミノ化反応を行うことを特徴とするリガンドの製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 6 の何れか 1 項に記載のリガンドを、表面に金属を有する支持体上に固定化させてなることを特徴とするリガンド担持体。

【請求項 9】

タンパク質の分析に使用されることを特徴とする請求項 8 に記載のリガンド担持体。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 6 の何れか 1 項に記載のリガンドを、支持体と接触させることによって、当該リガンドを支持体上に固定化させたりリガンド担持体を作成する工程と、
上記リガンド担持体を、タンパク質溶液と接触させた後、分子間相互作用の測定を行う工程と、

上記分子間相互作用の測定の後、質量分析を行って、上記リガンド担持体に結合しているタンパク質を同定する工程と、
からなることを特徴とするタンパク質の分析方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】2鎖又は3鎖の炭化水素誘導鎖からなる多岐構造を有するリガンド、リガンド担持体、および、そのリガンドを用いたタンパク質の分析方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、多分岐構造を有するリンカー化合物に還元末端を有する糖鎖が導入された新規リガンド、および、このリガンドを金や銀、銅などの金属で表面をコートしたチップ上に集合化させ固定化したりリガンド担持体に関するものである。さらに、本発明は上記リガンドを用いたタンパク質の分析方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生体内に存在する種々の糖は、生物の活動や生命を維持するためのメカニズムの中で重要な役割を果たしている。このような糖の機能を精密に解明するためには、糖の複雑な構造に基づいてそれらの機能を解析する必要がある。糖の機能解析には、構造が解明されている糖鎖を用いて、糖の構造を一部ずつ再現し、これによって糖全体の構造と機能との関係を明らかにする手法が用いられる。

【0003】

上記糖の機能解析の手法としては、例えば、表面プラズモン共鳴（以下、SPRと記載する）が知られている。すなわち、糖の一部を模擬したオリゴ糖を含んでなるリガンドをセンサチップ表面上に導入し、このリガンドが導入されてなるセンサチップを用いて、オリゴ糖と特異的に相互作用するタンパク質等の物質を特定する。これにより、オリゴ糖の構造に基づく生物活性の正しい評価を行うことができる。

【0004】

ところが、オリゴ糖は、1分子だけでは活性がそれほど高くないため、オリゴ糖の生物活性を評価する場合には、オリゴ糖をセンサチップ上に集合化させることが必要となる。つまり、集合化したオリゴ糖を用いて、タンパク質との相互作用を解析することにより、オリゴ糖の生物活性の評価を行うことが可能になる。

【0005】

そこで、本発明者らは、これまでに、センサチップ表面に固定可能な部位及びオリゴ糖を導入可能な部位を分子内に有するリンカー化合物を得、このリンカー化合物に1単位又は2単位のオリゴ糖を導入してなるリガンドを得ている。そして、このリガンドを用いることによって、センサチップ上に、オリゴ糖を集合化して導入することができることを見出している（例えば、特許文献1、非特許文献1等を参照）。

【特許文献1】特開2003-83969号公報（2003年3月19日公開）

【非特許文献1】「日本化学会第79回春季年会—講演予稿集II」、社団法人日本化学会、2001年3月15日、p. 1042

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記の各文献に記載されたりリガンドにおいては、導入される糖鎖（オリゴ糖鎖）は、発明者らによって合成された硫酸化糖に限られており、市販の還元末端を有するマルトース、ラクトースなどのオリゴ糖を導入しチップ化できるかどうかについては明らかにされていない。また、上記の文献に記載のリガンドを固定化して得られたセンサチップをSPRを用いた測定に使用した後に、チップ上の糖鎖と結合したタンパク質の同定に使用するという利用方法は、従来から提唱されてはいたが、データの満足できるものは存在しなかった。

【0007】

本発明は上述の問題点に鑑みてなされたものであって、市販の還元末端を有する糖を導入してなる新規リガンド、および、タンパク質の同定に使用することのできるリガンド担持体を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

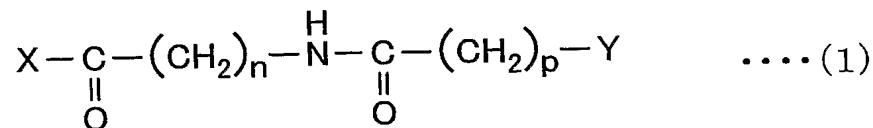
本願発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、先出願（特願 2003-190568：本願の出願前の確認時点で未公開）に記載のリンカー化合物（何れも本願発明者らによって見出されたもの）に市販のマルトースまたはラクトースを反応させ、それぞれ末端に α グルコピラノースまたは β ガラクトピラノースを 2 単位または 3 単位有する糖鎖リガンド複合体（リガンド）を合成した。さらに、本願発明者はこれらのリガンドを金コーティングチップに固定化させたシュガーチップ（リガンド担持体）を作製した。そして、これらのシュガーチップを用いてタンパク質との相互作用を検討するために、SPR 測定で相互作用を確認後、当該シュガーチップをそのまま MALDI-TOF/MS に供したところ、各シュガーチップに結合するタンパク質を同定することができることを見出し本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明のリガンドは、一般式（1）

【0010】

【化1】



【0011】

（式中、 n 、 p は 1 以上 6 以下の整数）にて表される構造を備え、上記 X として、末端に芳香族アミノ基を有するとともに、主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、2 鎖又は 3 鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備え、上記 Y として、硫黄原子を含む炭化水素鎖を備えているリンカー化合物と、還元末端を有する糖とが、上記芳香族アミノ基を介して結合している構造を有していることを特徴としている。

【0012】

上記炭化水素誘導鎖とは、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものを指すとする。すなわち、上記炭化水素誘導鎖とは、末端に芳香族アミノ基を有し、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素-炭素結合（C-C 結合）の一部が、炭素-窒素結合（C-N 結合）、炭素-酸素結合（C-O 結合）、アミド結合（C-O-NH 結合）に置き換わっていてもよいものを指す。

【0013】

また、上記硫黄原子を含む炭化水素構造とは、炭素及び水素からなる炭化水素構造にて、一部の炭素が硫黄に置き換わっているものを意味する。また、この硫黄原子を含む炭化水素構造は、鎖状（直鎖、枝分かれ鎖の両方を含む）であっても、環状であってもよく、また、鎖状構造および環状構造の両方の構造を含んでいてもよいものとする。

【0014】

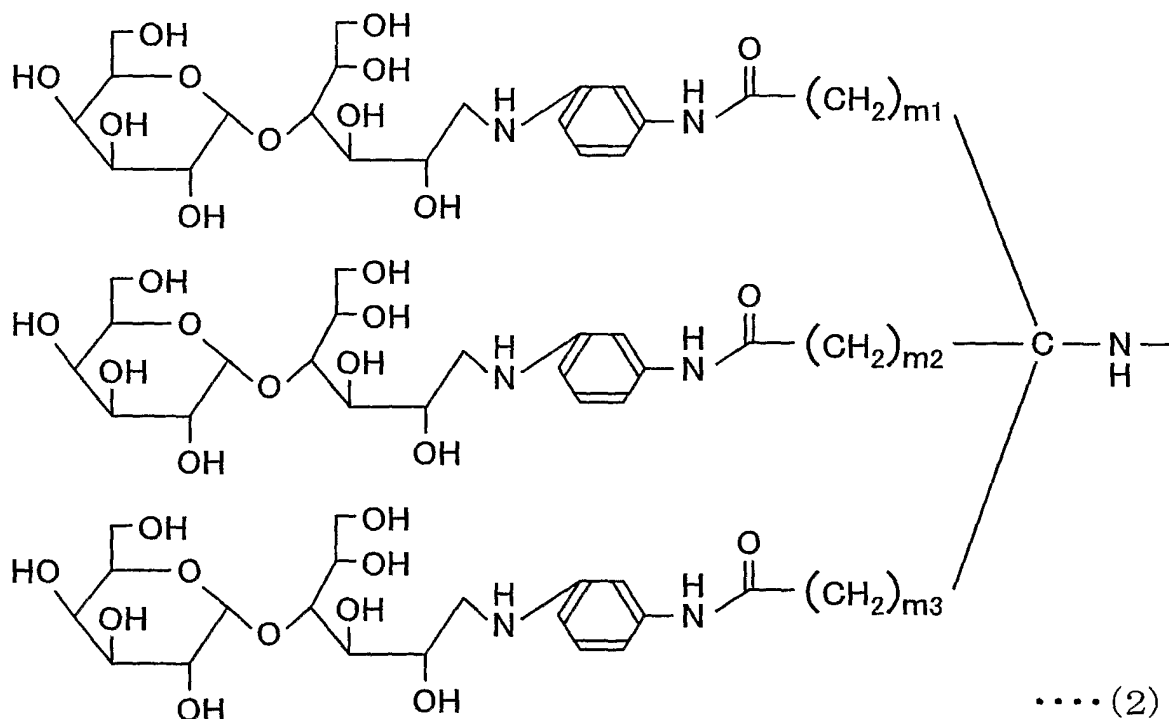
本発明のリガンドにおいて、上記リンカー化合物は、上記 Y として、S-S 結合または SH 基を含む炭化水素構造を備えているものであってもよい。つまり、上記硫黄原子を含む炭化水素構造中に、ジスルフィド結合（S-S 結合）またはチオール基（SH 基）が含まれていてもよい。

【0015】

本発明のリガンドにおいて、上記 X は、一般式（2）

【0016】

【化2】



【0017】

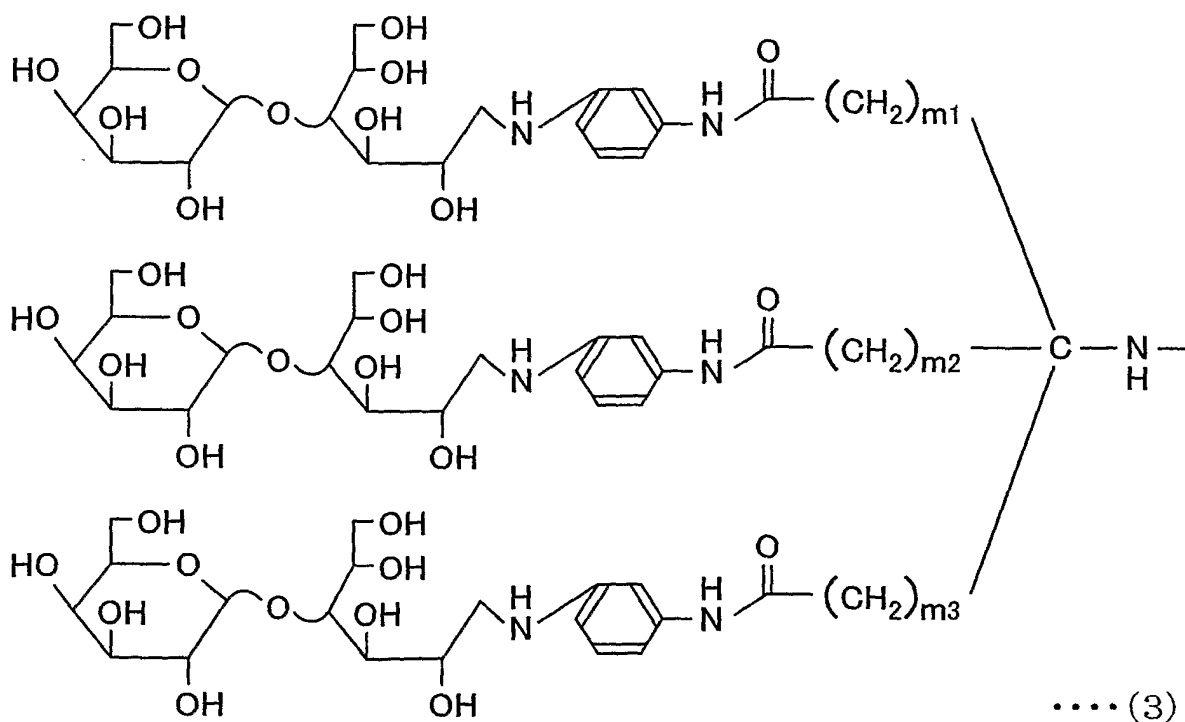
(式中、 m^1 , m^2 , m^3 はそれぞれ独立して1以上6以下の整数) にて表される構造を備えているものであってもよい。

【0018】

本発明のリガンドにおいて、上記Xは、一般式(3)

【0019】

【化3】



【0020】

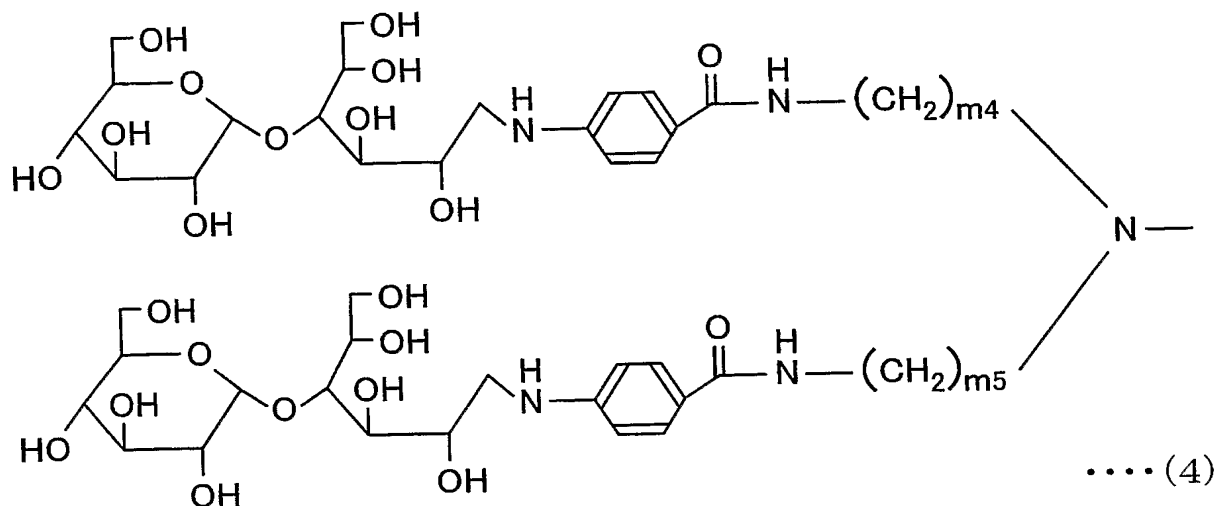
(式中、 m^1 、 m^2 、 m^3 はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えているものであってもよい。

【0021】

本発明のリガンドにおいて、上記 X は、一般式 (4)

【0022】

【化 4】



【0023】

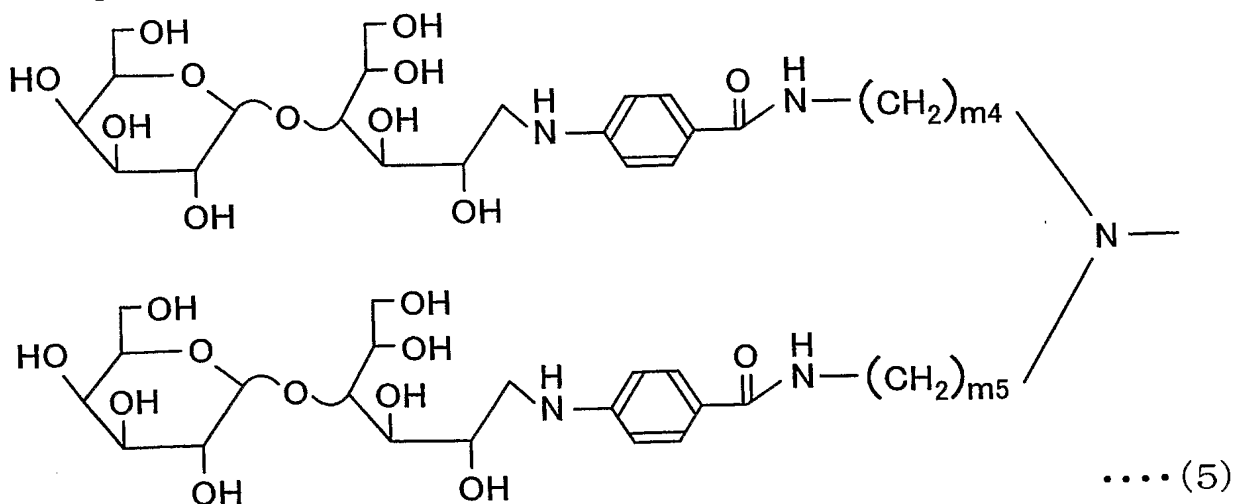
(式中、 m^4 、 m^5 はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えているものであってもよい。

【0024】

本発明のリガンドにおいて、上記 X は、一般式 (5)

【0025】

【化 5】



【0026】

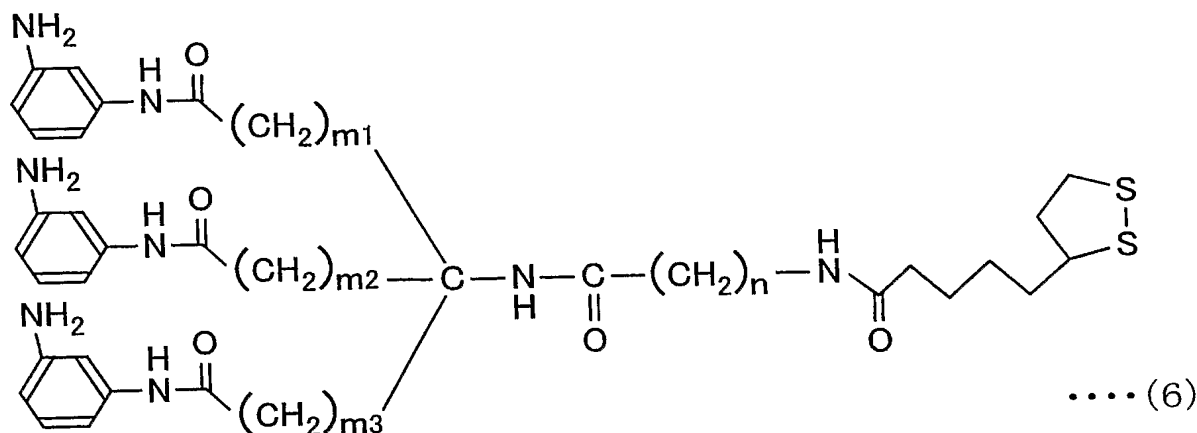
(式中、 m^4 、 m^5 は、それぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えているものであってもよい。

【0027】

また、本発明にかかるリガンドの製造方法は、一般式 (6)

【0028】

【化6】

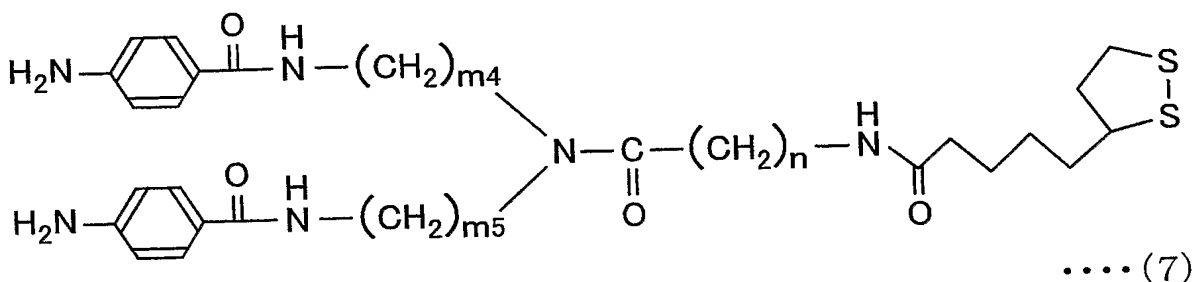


【0029】

(式中、 m^1 , m^2 , m^3 , n は1以上6以下の整数)にて表される構造を備えているリンカー化合物、または、一般式(7)

【0030】

【化7】



【0031】

(式中、 m^4 , m^5 , n は1以上6以下の整数)にて表される構造を備えているリンカー化合物と、還元末端を有する糖とを用いて還元アミノ化反応を行うことを特徴としている。

【0032】

また、本発明にかかるリガンド担持体は、上記の何れかのリガンドを、支持体上に固定化させてなることを特徴とするものである。そして、上記リガンド担持体は、タンパク質の分析に使用してもよい。

【0033】

また、本発明にかかるタンパク質の分析方法は、上記の何れかのリガンドを、支持体と接触させることによって、当該リガンドを支持体上に固定化させたりリガンド担持体を作成する工程と、上記リガンド担持体を、タンパク質溶液と接触させた後、分子間相互作用の測定を行う工程と、上記分子間相互作用の測定の後に質量分析を行って、上記リガンド担持体に結合しているタンパク質を同定する工程と、からなることを特徴としている。

【発明の効果】

【0034】

以上のように、本発明にかかるリガンドは、一つのリガンド内に2単位または3単位の糖分子を有しているので、上記リガンド同士が支持体表面に集合化することを避けつつ、糖分子については集合化させることができる。本発明のリンカー化合物を用いることによって、上記糖分子とタンパク質との相互作用を再現性よく評価することが可能になる。

【0035】

また、本発明にかかるリガンド担持体は、未知タンパク質の同定に利用することができ

るという効果を奏する。さらに、本発明にかかるタンパク質の分析方法によれば、未知タンパク質の同定を行うことができる。

【發明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下、本発明について詳細に説明する。

【 0 0 3 7 】

【0037】
本発明のリガンドは、表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサチップやアフィニティクロマトグラフィーの担持体等のタンパク質分析用の支持体に固定化されて用いられるものであり、支持体表面と結合することのできるリンカー化合物と、分析対象となるタンパク質などと特異的に相互作用することのできる糖鎖とから構成されている。上記SPRやアフィニティクロマトグラフィーでは、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質などの物質を特定することや分離することを目的としている。そのため、上記リガンドは、タンパク質等の物質と非特異的に相互作用を起こさないものであることが必要とされる。

【 0 0 3 8 】

【0038】
そこで、本発明のリガンドは、上記一般式（１）で表される構造を備えたリンカー部分（リンカー化合物）を有している。この構造中のＹで示す構造中には、硫黄原子（Ｓ）が含まれており、この硫黄原子（Ｓ）は、例えば、タンパク質分析用の支持体表面にコートされた金（Au）と、金属－硫黄結合（Au－Ｓ結合）を形成し、支持体に強固に結合することができる。

【0039】

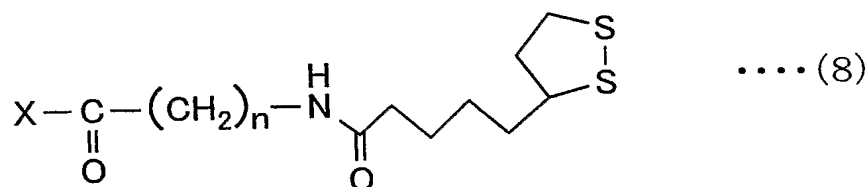
【0039】
また、上記リンカー化合物は、上記一般式(1)のXとして、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、2鎖又は3鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備えている。これによって、上記リンカー化合物は、タンパク質分析用の支持体表面に複数の糖分子を集合化して配列することができる。とともに、末端に芳香族アミノ基を有していることによって、糖分子を簡便に導入することができる。なお、上記一般式(1)において、n、pは1以上6以下の整数であれば限定されない。

【 0 0 4 0 】

【0040】
さらに、上記リンカー化合物として、上記一般式(1)において、pが4であり、Yとして、S-S結合を有する環状炭化水素構造を備えているものを挙げることができる。上記リンカー化合物としては、例えば一般式(8)

【 0 0 4 1 】

【化8】



【 0 0 4 2 】

【0042】
にて表される構造を備えるものであってもよい。このリンカー化合物は、チオクト酸を原料として合成することが可能である。

【0043】

【0043】
上記一般式(8)にて表されるリンカー化合物は、ジスルフィド結合(S-S結合)が含まれており、このS-S結合中の硫黄(S)は、例えば、タンパク質分析用の支持体表面にコートされた金(Au)と、金属-硫黄結合(Au-S結合)を形成し、支持体に強固に結合することができる。なお、上記Yとしては、一般式(8)で示されるものに限定されることはないが、金属-硫黄結合(Au-S結合)を容易に形成することができるといふ点で、S-S結合またはSH基が含まれている炭化水素構造であることが好ましい。

【0044】

そして、本発明のリガンドには、上記リンカー化合物の芳香族アミノ基に、還元末端を有する糖鎖が導入されている。言い換えれば、本発明のリガンドは、上記リンカー化合物と、還元末端を有する糖とが、芳香族アミノ基を介して結合している構造を有している。この糖の導入は、例えば、上記リンカー化合物の芳香族アミノ基のアミノ基（ $-NH_2$ 基）と糖との還元アミノ化反応によって行うことができる。つまり、糖中の平衡によって生じるアルデヒド基（ $-CHO$ 基）またはケトン基（ $-C(=O)R$ 基、 R は炭化水素基）と、上記リンカー化合物が有するアミノ基とが反応する。そして、この反応によって形成された Schiff 塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に容易に糖を導入することができる。

【0045】

本発明では、特に上記還元末端を有する糖として、上記先出願に記載のような発明者らによって合成された硫酸化糖ではなく、市販のもの、あるいは、市販の多糖を分解して調整したものを用いる。なお、上記「還元末端を有する糖」とは、アノマー炭素原子が置換を受けていない単糖またはオリゴ糖である。つまり、上記還元末端を有する糖とは、還元糖である。

【0046】

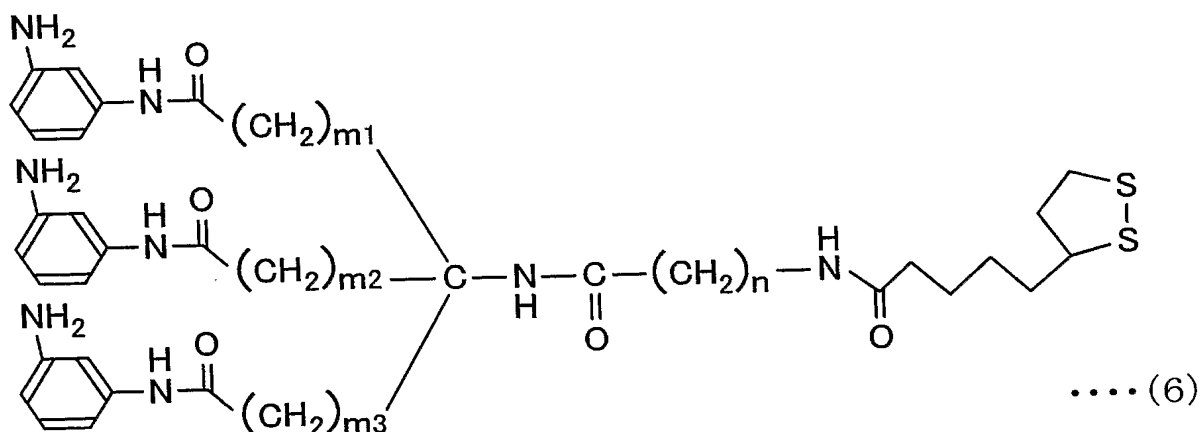
上記還元末端を有する糖としてより具体的には、マルトース、ラクトース、パノース、セロビオース、メリビオース、マンノオリゴ糖、キトオリゴ糖、ラミナリオリゴ糖などが挙げられるが、これに限定されることはない。このように、マルトースやラクトースなどのオリゴ糖を有するリガンドは、従来の硫酸化糖を有するリガンドと比較して、タンパク質測定に関して応用範囲が広いと言う利点を有している。

【0047】

本発明のリガンドとして具体的には、一般式（6）

【0048】

【化9】

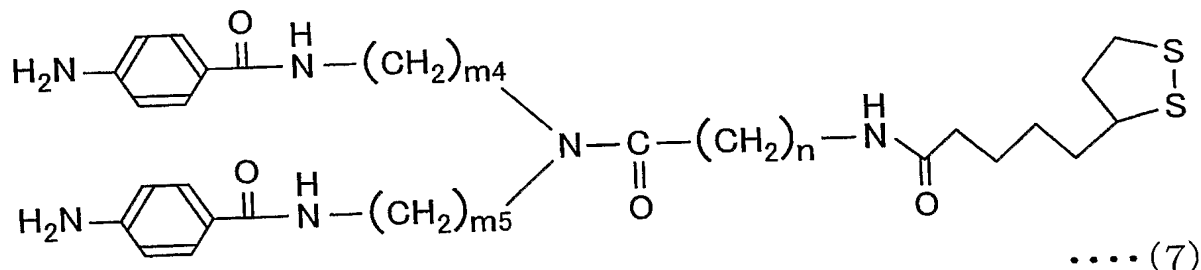


【0049】

（式中、 m^1 , m^2 , m^3 , n はそれぞれ独立して 1 以上 6 以下の整数）にて表される構造を有するリンカー化合物、または、一般式（7）

【0050】

【化10】



【0051】

(式中、 m^4 , m^5 , n はそれぞれ独立して1以上6以下の整数)にて表される構造を有するリンカー化合物の芳香族アミノ基に、還元末端を有する糖が導入された構造を有するものが挙げられる。

【0052】

上記のリガンドは、例えば、上記一般式(6)にて表される構造を有するリンカー化合物、または、一般式(7)にて表される構造を有するリンカー化合物と、還元末端を有する糖とを用いて還元アミノ化反応を行うことによって製造することができる。

【0053】

上記一般式(6)にて表される構造を有するリンカー化合物とは、つまり、炭化水素誘導鎖を3鎖有するものであり、末端に芳香族アミノ基を有する3鎖の炭化水素誘導鎖が、1つの炭素(C)に結合することによって分岐構造を形成している。なお、上記一般式(6)において、 m^1 , m^2 , m^3 , n は、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同じ整数であってもよい。このうち、上記 $m^1 \sim m^3$ は、製造時の簡便さの点から互いに同じ整数であることが好ましく、特に2であることが好ましい。

【0054】

また、上記一般式(7)にて表される構造を有するリンカー化合物とは、つまり、炭化水素誘導鎖を2鎖有するものであり、末端に芳香族アミノ基を有する2鎖の炭化水素誘導鎖が、1つの窒素(N)に結合することによって分岐構造を形成している。なお、上記一般式(7)において、 m^4 , m^5 , n は、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同じ整数であってもよい。このうち、上記 m^4 , m^5 は、製造時の簡便さの点から互いに同じ整数であることが好ましく、特に2であることが好ましい。

【0055】

このように、上記Xは、炭素や窒素等の原子にて、上記炭化水素誘導鎖を複数結合して分岐構造を形成している多分岐型部位である構造を備えている。なお、上記Xに含まれる複数の炭化水素誘導鎖は、すべて同じであることが好ましいが、末端に芳香族アミノ基を有していれば、互いに異なる構造であってもよい。

【0056】

以上のように、本発明のリガンドに含まれるリンカー化合物は、タンパク質分析用の支持体に結合可能な硫黄原子と、オリゴ糖鎖等の糖分子に結合可能なアミノ基とを有している。従って、例えばAu-S結合などの金属-硫黄結合により上記リンカー化合物が、タンパク質分析用の支持体上に固定されるので、上記リンカー化合物を介して、上記支持体上に糖分子を強固にかつ簡単に結合させることができる。

【0057】

また、上記リンカー化合物は、多分岐型部位を有し、該多分岐型部位の各末端に芳香族アミノ基を有している。そのため、上記リンカー化合物に還元末端を有する糖が導入された本発明のリガンドを用いることにより、上記支持体表面に効率よく糖分子を集合化させることができる。

【0058】

さらに、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができる。それゆえ、上記リンカー化合物を有する本発明のリガンドを用いることによって、上記糖とタンパク質との相互作用を再現性よく評価することが可能になる。

【0059】

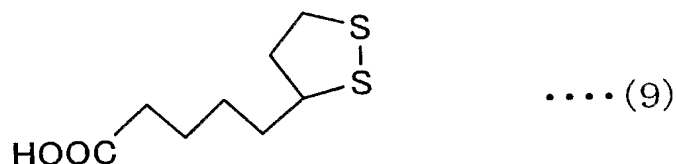
上記リンカー化合物は、例えば以下に示す製造方法によって製造される。つまり、上記リンカー化合物は、チオクト酸と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を2鎖または3鎖有する多分岐構造を含んでなるアミン化合物との縮合反応を行い、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護することによって製造される。

【0060】

上記チオクト酸は、下記一般式(9)

【0061】

【化11】



【0062】

にて表される構造を備えている。

【0063】

また、上記アミン化合物は、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する分岐鎖を含んでいれば特に限定されるものではなく、上記したリンカー化合物の多分岐部位に相当する構造を含んでいればよい。

【0064】

従って、上記分岐鎖は、上記した炭化水素誘導鎖に含まれる芳香族アミノ基の代わりに、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する以外は、上記炭化水素誘導鎖に含まれる構造を有していればよい。つまり、上記分岐鎖は、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものである。より具体的には、上記分岐鎖は、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有するとともに、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素-炭素結合(C-C結合)の一部が炭素-窒素結合(C-N結合)、また炭素-酸素結合(C-O結合)に置き換わっていてもよいものである。

【0065】

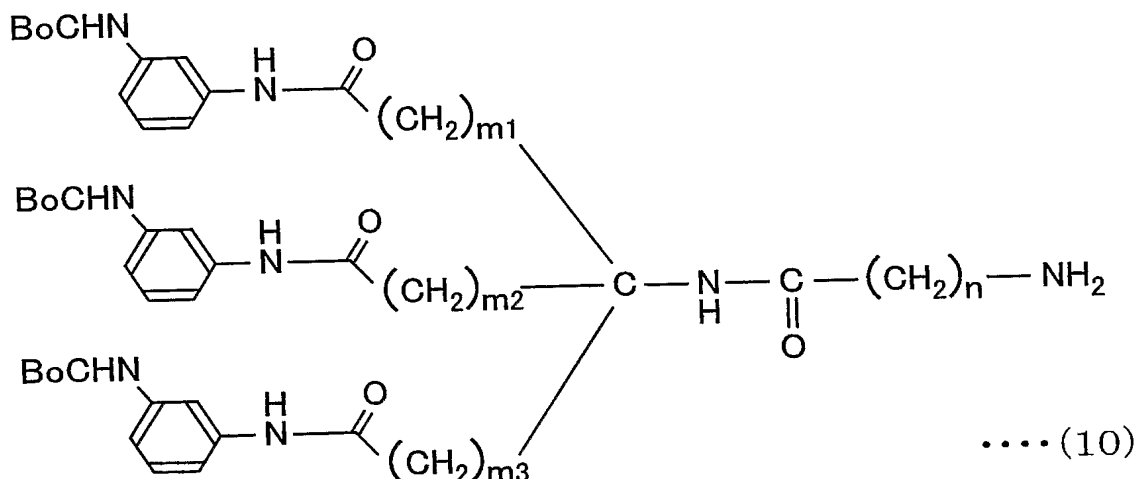
また、上記保護基とは、芳香族アミノ基のアミノ基が上記縮合反応によって反応しないように導入される置換基である。このような保護基は、二級アミノ基の保護基を脱保護する際に影響を受けないものであれば、特に限定されるものではない。上記保護基としては、例えば、t-ブトキシカルボニル基(-COOC(CH₃)₃基; Boc基と記載する)、ベンジル基、アシルカルバメート基(-COOCH₂CH=CH₂、Alloc基)等を挙げることができる。

【0066】

上記アミン化合物としては、例えば、下記一般式(10)

【0067】

【化 1 2】



【0068】

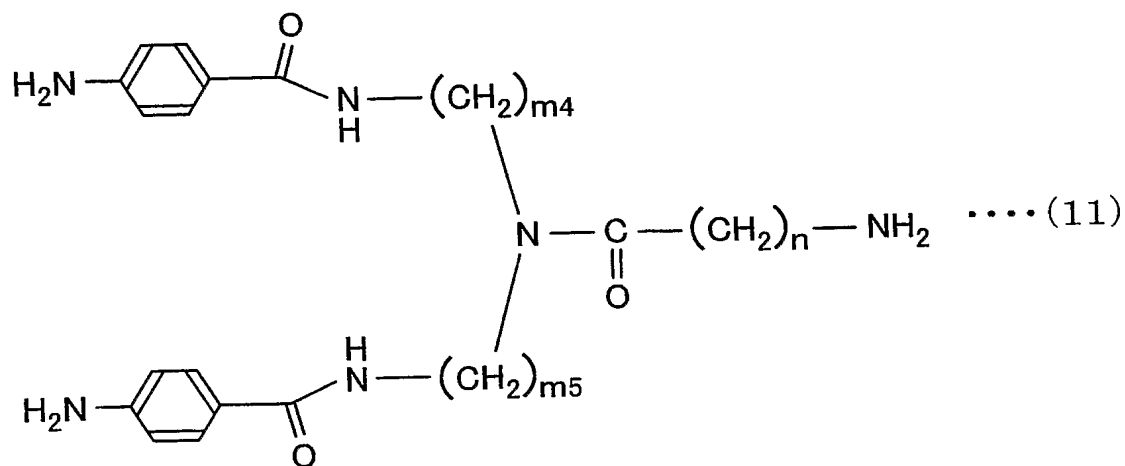
にて表される構造を備えている第1級アミン化合物を挙げることができる。なお、上記一般式(10)中の n , $m^1 \sim m^3$ は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数である。この一般式(10)にて表されるアミン化合物と、チオクト酸との縮合反応、および、その後に行われる芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護によって得られるリンカー化合物は、上記一般式(6)にて表されるリンカー化合物である。

【0069】

また、上記アミン化合物の他の例としては、例えば、下記一般式(11)

【0070】

【化 1 3】



【0071】

にて表される構造を備えている第2級アミン化合物を挙げることができる。なお、上記一般式(11)中の n , m^4 , m^5 は、それぞれ独立して、1以上6以下の整数である。この一般式(11)にて表されるアミン化合物と、チオクト酸との縮合反応、および、その後に行われる芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護によって得られるリンカー化合物は、上記一般式(7)にて表されるリンカー化合物である。これらのアミン化合物の合成方法については、後の実施例にて詳述する。

【0072】

上記チオクト酸とアミン化合物との縮合反応により、チオクト酸のカルボキシル基(—COOH基)と、アミン化合物のアミノ基(—NH₂基)とが縮合して、アミド結合が形

成される。その後、芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護して、保護基を取り外し、芳香族アミノ基にすることによって、上記したリンカー化合物を得ることができる。

【0073】

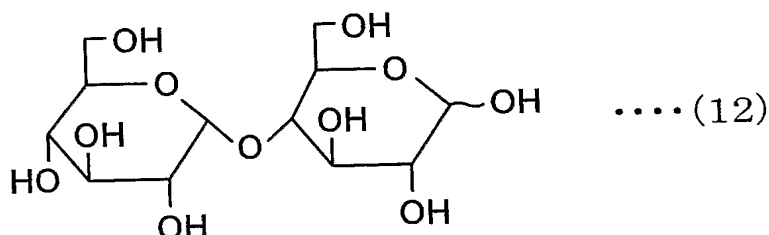
本発明のリガンドは、上述のようにして作製されたリンカー化合物に、還元末端を有するマルトースやラクトースなどのオリゴ糖が導入されたものである。本発明のリガンドとして具体的には、以下に示す4種類のものを挙げるることができる。

【0074】

1番目のリガンドは、上記一般式(8)にて表される構造において、上記Xとして上記一般式(2)にて表される構造を備えているものである。この一般式(2)にて表される構造を備えているリガンドは、上記一般式(6)にて表されるリンカー化合物に、下記一般式(12)

【0075】

【化14】



【0076】

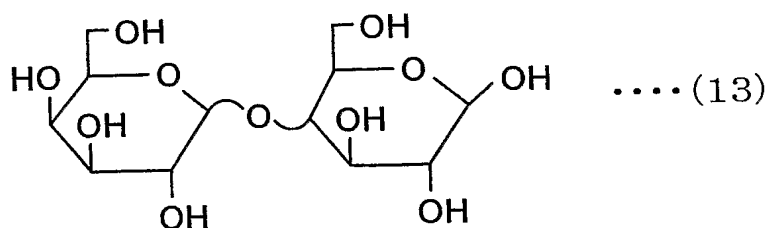
にて表される構造を有するマルトースを導入してなるものである。

【0077】

2番目のリガンドは、上記一般式(8)にて表される構造において、上記Xとして上記一般式(3)にて表される構造を備えているものである。この一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、上記一般式(6)にて表されるリンカー化合物に、下記一般式(13)

【0078】

【化15】



【0079】

にて表される構造を有するラクトースを導入してなるものである。

【0080】

この1, 2番目のリガンドは、3鎖の炭化水素誘導鎖を有しているリンカー化合物にオリゴ糖が導入されているので、末端に3単位のオリゴ糖を有している。言い方を換えれば、上記1番目のリガンドは、末端に3単位の α -グルコピラノースを有しており、上記2番目のリガンドは、末端に3単位の β -ガラクトピラノースを有している。なお、上記一般式(2)、(3)において、 $m^1 \sim m^3$ は、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同じ整数であってもよい。また、上記一般式(1)において、 n は1以上6以下の整数であれば特に限定されない。

【0081】

また、3番目のリガンドは、上記一般式(1)にて表される構造において、上記Xとして上記一般式(4)にて表される構造を備えているものである。この一般式(4)にて表される構造を備えているリガンドは、上記一般式(8)にて表されるリンカー化合物に、

上記一般式(12)にて表される構造を有するマルトースを導入してなるものである。

【0082】

4番目のリガンドは、上記一般式(8)にて表される構造において、上記Xとして上記一般式(5)にて表される構造を備えているものである。この一般式(5)にて表される構造を備えているリガンドは、上記一般式(7)にて表されるリンカー化合物に、上記一般式(13)にて表される構造を有するラクトースを導入してなるものである。

【0083】

この3, 4番目のリガンドは、2鎖の炭化水素誘導鎖を有しているリンカー化合物にオリゴ糖が導入されているので、末端に2単位のオリゴ糖を有している。言い方を換えれば、上記3番目のリガンドは、末端に2単位の α -グルコピラノースを有しており、上記4番目のリガンドは、末端に2単位の β -ガラクトピラノースを有している。なお、上記一般式(4)、(5)において、 m^4 , m^5 は、1以上6以下の整数であれば限定されず、互いに異なる整数であってもよく、一部あるいは全てが同じ整数であってもよい。また、上記一般式(8)において、 n は1以上6以下の整数であれば特に限定されない。

【0084】

上記のリガンドは、いずれもリンカー化合物と糖分子とを含んでなっているので、リンカー化合物内のS-S結合にて、タンパク質分析用の支持体表面の金属と、金属-硫黄(S)結合、例えば金-硫黄(Au-S)結合により結合することができる。これにより、このAu-S結合を介して、上記支持体表面に2単位または3単位の糖分子を集合化して固定化されてなるリガンド担持体を提供することができる。上記支持体表面の金属としては、上記Auの他、Cu、Ag、Pt等の金属を用いることができるが、特にAuを用いることが好ましい。

【0085】

また、上記4種類の各リガンドは、後述の実施例に示されるように、タンパク質と異なる相互作用を示すことが確認された。それゆえ、未知タンパク質の同定に有効に利用することができると考えられる。

【0086】

なお、本発明のリガンドに導入されている上記オリゴ糖は、同一の単糖分子からなる単一オリゴ糖であってもよいし、種々の単糖分子やその誘導体からなる複合糖質であってもよい。また、上記オリゴ糖は、いずれも、自然界から単離・精製して得られる種々の天然の糖であってもよく、人工的に合成された糖であってもよい。また、上記オリゴ糖は、多糖を分解して得られたものであってもよい。

【0087】

また、上述のような本発明のリガンドを、表面に金属を有する支持体に金属-硫黄結合を介して固定化させてなるリガンド担持体も本発明に含まれる。このリガンド担持体はタンパク質分析の用途に限定されず、糖分子との相互作用を調べるために、タンパク質以外の物質の分析用として用いることもできる。

【0088】

上記リガンド担持体は、該リガンドを含むリガンド溶液と表面に金属膜を有する支持体とを接触させることにより、リガンドのS-S結合の各S原子が、支持体表面の金属と金属-硫黄結合によって結合して、支持体表面に上記リガンドが導入される。具体的には、上記リガンド溶液に、タンパク質分析用の支持体を所定時間浸漬する、あるいは、上記支持体にリガンド溶液を注入する(支持体表面にリガンド溶液を流す)ことによって、上記リガンド(リガンドに含まれるリンカー化合物)のS-S結合を、上記支持体表面の金等とのAu-S結合に変換して、支持体表面に上記リガンドを固定することができる。

【0089】

リガンド溶液に用いる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、メタノール、水、ジメチルアセトアミド(DMAc)や、これらの混合溶媒等を挙げることができる。また、浸漬時間は、0.5時間~12時間程度であればよく、注入濃度は、 $1\mu\text{M}$ ~1mM程度であればよい。

【0090】

このように、本発明のリガンドは、S-S結合を有しているので、タンパク質分析用の支持体表面に簡単に固定化することができ、上記支持体上に糖分子を簡単に導入することができる。

【0091】

本発明のリガンド担持体は、糖分子と、例えばタンパク質等の他の物質との相互作用の分析に、利用可能である。具体的には、上記リガンド担持体は、SPR測定、アフィニティクロマトグラフィ等に適用することができる。

【0092】

例えば、タンパク質分析として、SPR測定を行うには、以下のようにすればよい。すなわち、金薄膜等の金属薄膜を蒸着した支持体に、本発明のリガンドを固定化してなるリガンド担持体を用い、該リガンド担持体とタンパク質とを接触させ、常法に従って、表面プラズモン共鳴装置を用いて共鳴角度を測定すれば、該リガンド担持体とタンパク質との結合挙動を観測することができる。なお、SPR測定に用いる上記支持体（センサチップ）としては、例えば、ガラス、プラスチック等を用いることができ、特にガラスが好適に用いられる。また、リガンド担持体とタンパク質の接触は、例えば、タンパク質をランニングバッファに溶解した溶液を、該リガンド担持体の表面に流入することにより行えばよい。このランニングバッファとしては、例えば、リン酸緩衝溶液等を挙げることができる。

【0093】

また、本発明のリガンド担持体は、後述の実施例に示されるように、タンパク質と異なる相互作用を示すことが確認されているため、タンパク質の同定に利用することができる。つまり、本発明のリガンド担持体を用いて未知タンパク質の分析を行うことによって、そのタンパク質が糖結合性タンパク質であるか否か、また、そのタンパク質がどの種のタンパク質であるかを容易に判定することができる。なお、上記4種類のリガンドをそれぞれ固定化したリガンド担持体のうち、少なくとも2種類を一組のセットとして含むチップセットを作製すれば、より簡便にタンパク質（特に、タンパク質）の同定を行うことができるため有用である。

【0094】

ここで、本発明のリガンド担持体の利用方法について説明する。本発明のリガンド担持体は、分子間相互作用の測定（例えば、以下のようなSPR測定）にセンサチップとして使用することができる。すなわち、第1のリガンド担持体が支持体表面に固定化されてなる第1のセンサチップと、上記第1のリガンド担持体とは種類の異なる第2のリガンド担持体が支持体表面に固定化されてなる第2のセンサチップとを用いて、第1のセンサチップを用いて得られたSPR測定の検出結果と、第2のセンサチップを用いて得られたSPR測定の検出結果との差を検出し、糖分子の相互作用を観測することができる。

【0095】

これらのセンサチップには、固定化される糖分子が異なっているリガンド、あるいは、固定化されている糖分子は同じであるがリンカー化合物の部分が異なっているリガンドを用いればよい。この種類の異なるリガンド担持体としては、例えば上述の4種類の各リガンドを挙げることができる。そして、上記4種類のリガンドのうちから、リンカー化合物部分は同じ構造を有しているが、オリゴ糖の部分が異なる構造を有するもの（すなわち、上記1番目のリガンドと2番目のリガンドのセット、あるいは、上記3番目のリガンドと4番目のリガンドとのセット）を選択することが好ましい。

【0096】

上記SPR測定では、第1のセンサチップの糖分子に特異的に作用するタンパク質等を用いて、測定条件を一定にして、上記2つのセンサチップに作用させ、両者の共鳴角度を観測する。この両者の共鳴角度の差を検出することで、糖分子とタンパク質等との特異的な相互作用として測定することができる。

【0097】

また、糖分子との相互作用を観測する物質は、タンパク質に限定はされない。

【0098】

上記では、2つの種類のセンサチップ同時に測定したが、これに限定されることはなく、2種類以上のセンサチップを測定してもかまわないし、同時に測定しなくてもかまわない。また、少なくとも1つのセンサチップに糖分子を導入していないものを用いてもよい。例えば、リンカー化合物のみを固定化したものを用いてもよい。

【0099】

上記のようなSPR測定を行うと、糖分子以外は同じ構造のリガンドを有する少なくとも2つのセンサチップを用いて、測定をすることができるため、少なくとも2つのセンサチップ相互作用の差は、糖分子に起因したものととして観測される。従って、上記測定方法を用いれば、糖分子以外の部分と、他の物質との非特異的な相互作用を低減させ、糖分子と他の物質との特異的な相互作用を観測することができる。

【0100】

また、糖分子は同じであって、リンカー化合物部分の構造が異なるリガンドが固定化された2種類のセンサチップを用いて上記のようなSPR測定を行ってもよい。この場合は、センサチップ上の糖分子の集合化度の違いによるタンパク質の結合挙動を測定することができる。このようなセンサチップのセットの例としては、上記1番目のリガンドと3番目のリガンドとのセットを挙げることができる。

【0101】

さらに、上述のSPR測定によって糖分子と他の物質との特異的な相互作用を確認した後、SPR測定に使用したタンパク質の結合したリガンド担持体をそのまま質量分析にかければ、センサチップと結合したタンパク質を同定することができる。上記質量分析は、マトリックス支援型レーザー脱離/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF/MS)などの従来公知の質量分析計を使用し、従来公知の方法に従って実施すればよい。

【0102】

上述したような手順を用いれば、本発明のリガンドを用いてタンパク質の分析を行うことができる。つまり、本発明のタンパク質の分析方法は、上記の本発明のリガンドを、表面に金属を有する支持体と接触させることによって、当該リガンドを支持体上に固定化させたリガンド担持体を作成する工程と、上記リガンド担持体を分析対象となるタンパク質を含む溶液と接触させて相互作用させた後、例えばSPRのような分子間相互作用の測定を行う工程と、上記分子間相互作用測定の後、質量分析を行って、上記リガンド担持体に結合しているタンパク質を同定する工程とからなるものである。

【0103】

このタンパク質の分析方法においては、上述したように、種類の異なるリガンドが固定化された2種類以上のリガンド担持体を用いてそれぞれタンパク質の分析を行って、それぞれの結果を比較検討し各タンパク質の特性を解析することができる。

【0104】

本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0105】

以下、本発明のリガンドの合成についてより詳細に説明する。また、本実施例では、合成したリガンドを用いてSPR測定と質量分析を行い、タンパク質の分析を行った。それについても併せて説明する。

【0106】

〔実施例1：リガンドの合成〕

本実施例では、実施の形態において説明した1～4番目のリガンドにそれぞれ分類される4個のリガンドを合成した。

【0107】

(1) 1 番目のリガンドの合成

上記 1 番目のリガンドの一つである、上記一般式 (8) にて表される構造において、 n が 1 であり、 X が一般式 (2) にて表され、 m^1 , m^2 , m^3 が 2 である構造を有するリガンド (図 1 に示す化合物 1) を以下の手順で合成した。

【0108】

上記リガンド (化合物 1) の合成の前段階として、まず、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を 3 鎖有するリンカー化合物 (図 1 に示す化合物 A) の合成を行った。

【0109】

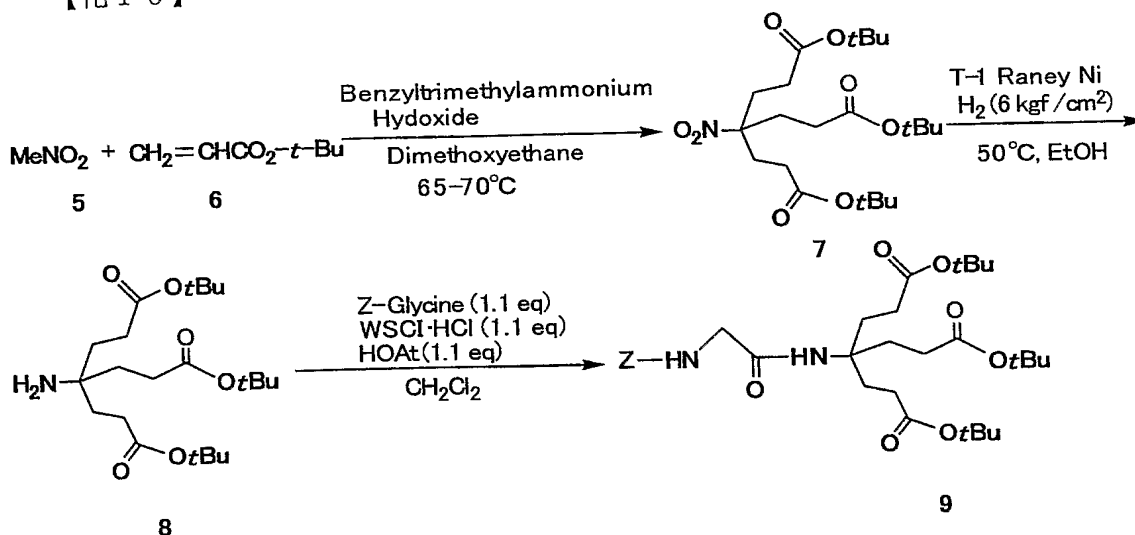
まず、下記一般式 (14) にて示すように、 $65^{\circ}\text{C}-70^{\circ}\text{C}$ のジメトキシエタン中、水酸化ベンジルトリメチルアンモニウムの存在下にて、ニトロメタン (化合物 5) に対し、3 単位の t -ブチルアクリレート (化合物 6) をマイケル付加させ、91% の収率にて化合物 7 を得た。次いで、水素雰囲気下 ($6\text{ kg}/\text{cm}^2$)、 50°C のエタノール中にて、ラネーニッケル (Raney Ni) を用いて、上記化合物 7 のニトロ基を還元して、98% の収率にて化合物 8 を得た。

【0110】

その後、 CH_2Cl_2 中、1.1 当量の 1-ヒドロキシー-7-アザペンゾトリアゾール (式中、 $\text{WSCl}\cdot\text{HCl}$ 、 HOAt)、1.1 当量の水溶性カルボジイミド塩酸塩 (式中、 $\text{WSCl}\cdot\text{HCl}$) の存在下にて、上記化合物 8 に 1.1 当量の Z -グリシンを縮合させ、85% の収率にて Z -グリシン体 (化合物 9) を得た。

【0111】

【化 16】



....(14)

【0112】

より具体的に説明すれば、上記化合物 8 は、文献 (G. R. Newkome ら、OPPI BRIEFS, 28 巻, p.495, 1996) の方法に従って、まず、ニトロメタン (12.2 g, 200 mmol) を 1, 2-ジメトキシエタン 50 mL に溶解して、 $65-70^{\circ}\text{C}$ に加熱し、40% 水酸化ベンジルトリメチルアンモニウムメタノール溶液 (2 mL) を加えて、ニトロメタン溶液とした。次いで、このニトロメタン溶液の温度を 75°C まで上昇させ、 t -ブチルアクリレート (90.8 mL, 620 mmol) をゆっくり滴下した後、溶液温度を $70-75^{\circ}\text{C}$ に保ちながら、40% 水酸化ベンジルトリメチルアンモニウムメタノール溶液を 1 mL ずつ 4 回に分けて加えて 2.5 時間攪拌し、ニトロメタン/ t -ブチルアクリレート反応溶液中の不溶物をデト反応溶液を得た。このニトロメタン/ t -ブチルアクリレート反応溶液中の不溶物をデカンテーションにより取り除いて濃縮し、得られた残渣をジエチルエーテルに溶かして、

氷冷した 10% 塩酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び水で 2 回ずつ洗浄して残渣溶液を得た。その後、乾燥剤として無水硫酸ナトリウムを用いて、該残渣溶液を乾燥させ、セライトを用いて該乾燥剤を除去して、減圧濃縮した後、濃縮残渣をエタノールに溶解して再結晶を行い、化合物 7 (81.8 g, 91%) を白色針状結晶として得た。

【0113】

続いて、化合物 7 の結晶 (10 g, 22.4 mmol) と T-1 ラネーニッケル (6.0 g) とを無水エタノール 50 mL に加え、 6 kg/cm^2 の水素雰囲気下、50℃で 23 時間攪拌した後、セライトを用いて T-1 ラネーニッケルを濾去することによって得られた化合物 7 反応溶液を減圧濃縮した。この化合物 7 反応溶液の減圧濃縮によって得られた濃縮残渣を、分取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム/メタノール = 20/1) で精製し、化合物 8 (収量 9.2 g、収率 98%) を白色固体として得た。

【0114】

より具体的には、Z-グリシン (1.26 g, 6.62 mmol) と、HOAt (0.90 g, 6.62 mmol) と、WSCl \cdot HCl (1.27 g, 6.62 mmol) とを無水ジクロロメタン (28 mL) に溶かした Z-グリシン溶液に、0℃の温度条件下、化合物 8 (2.50 g, 6.02 mmol) を無水ジクロロメタン (2 mL) に溶かした化合物 8 溶液を加えて、アルゴン雰囲気下、室温で 36 時間攪拌して、Z-グリシン/化合物 8 反応溶液を得た。この Z-グリシン/化合物 8 反応溶液に、ジクロロメタンと 10% クエン酸水溶液とを加えてジクロロメタンで抽出し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、および水で 1 回ずつ洗浄し、乾燥剤として無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた後、該乾燥剤を濾去して減圧濃縮を行った。この減圧濃縮によって得られた濃縮残渣を分取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム) で精製し、化合物 9 (収量 3.09 g、収率 85%) を白色固体として得た。

【0115】

得られた上記化合物 9 の ESI-MS (positive) 測定 (飛行時間型質量分析計測定) を行ったところ、 m/z (質量/電荷比) 629.4 [(M+Na) $^+$] であった。これにより、化合物 9 の構造を確認することができた。

【0116】

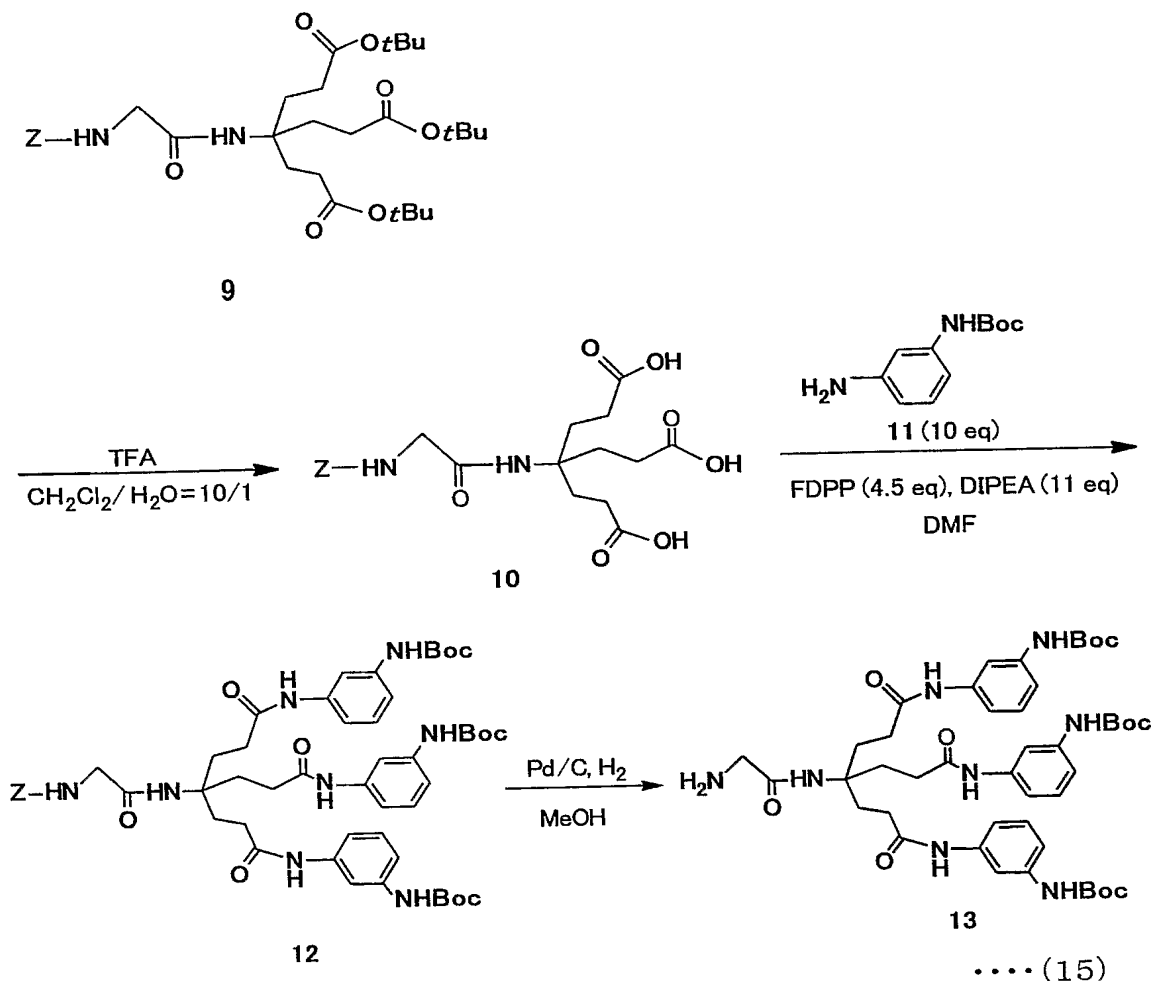
次に、下記一般式 (15) にて示すように、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O} = 10/1$ の混合溶媒中にて、トリフルオロ酢酸 (以下、TFA と記載する) を用いて、上記化合物 9 の *t*-ブトキシカルボニル基 ($-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ 基; 一般式 (15) 中、*t*Bu) を脱保護して、収率 95% にて化合物 10 を得た。

【0117】

その後、4.5 当量のペンタフルオロフェニルジフェニルホスフェート (式中、FDP P)、11 当量のジイソプロピルエチルアミン (式中、DIEA)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) の存在下にて、上記化合物 10 と Boc 基によってアミノ基が保護された *m*-フェニレンジアミン誘導体 (化合物 11、10 当量) とを縮合させ、収率 99% にて N-Boc アミン誘導体 (化合物 12) を得た。続いて、メタノール (図中、MeOH) 中、Pd/C (活性炭担持パラジウム) の存在下にて接触水素還元を行い、化合物 12 に縮合した上記 Z-グリシンのベンジルオキシカルボニル基 (式中、Z 基) を脱保護して、収率 79% にて化合物 13 を得た。

【0118】

【化 17】



【0119】

上記化合物 10～13 を得るために、具体的には、以下の操作を行った。

【0120】

すなわち、化合物 10 を得るために、化合物 9 (2.98 g, 4.90 mmol) をジクロロメタン (15 mL) に溶かし、 -10°C で TFA (15 mL) と水 (1.5 mL) とを加えた後、室温で 1.5 時間攪拌して化合物 9 反応溶液を得た。該化合物 9 反応溶液を減圧濃縮した後、氷浴中で濃縮残渣に pH が 5 になるまで 10 % 水酸化ナトリウム水溶液を加え、さらに pH が 2 になるまで濃塩酸を加えて、白色固体を析出させた。得られた白色固体を水で洗浄し、化合物 10 (収量 2.04 g、収率 95 %) を白色固体として得た。

【0121】

得られた上記化合物 10 の ESI-MS (negative) 測定を行ったところ、 m/z 437.1 $[(M-H)^-]$ であった。また、核磁気共鳴 (^1H -NMR、400 MHz, d_6 -DMSO) 測定を行ったところ、 δ = 7.34–7.14 (6H, m), 5.00 (1H, s), 3.55 (2H, d, J = 5.9 Hz), 3.33 (3H, bs), 2.11 (6H, m), 1.81 (6H, m) であった。これらにより、化合物 10 の構造を確認することができた。

【0122】

また、化合物 11 を得るために、*m*-フェニレンジアミン (0.50 g, 4.62 mmol) をメタノール (35 mL) に溶かし、 0°C で $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.06 mL, 4.62 mmol) とトリエチルアミン (0.65 mL, 4.65 mmol) とを加えた後、室温で 24 時間攪拌して、減圧濃縮を行った。該減圧濃縮によって得られた濃縮残渣を分

取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム/アセトン=10/1) で精製し、化合物 11 (収量 665 mg、収率 68%) を白色固体として得た。

【0123】

上記化合物 11 の ESI-MS (positive) 測定を行ったところ、 m/z 231.2 [(M+Na)⁺] であった。また、¹H-NMR (400 MHz, CD₃Cl) 測定を行ったところ、 δ =7.02 (1H, t, J=8.0 Hz), 6.95 (1H, bs), 6.54 (1H, dd, J=2.0 Hz, J=8.0 Hz), 6.41 (1H, bs), 6.35 (1H, dd, J=2.2 Hz, J=7.9 Hz), 3.66 (2H, bs), 1.53, 1.50 (9H, s, s) であった。これらにより、化合物 11 の構造を確認することができた。

【0124】

また、化合物 12 を得るために、上記化合物 10 (100 mg, 228 μ mol)、上記化合物 11 (475 mg, 2.28 mmol)、FDPP (394 mg, 1.03 mmol)、及びジイソプロピルエチルアミン (447 μ L, 2.57 mmol) を無水ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶かし、アルゴン雰囲気下で、室温で 29 時間攪拌した後、酢酸エチル及び水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 0.5 N 塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で 1 回ずつ洗浄して、乾燥剤として無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させて、乾燥反応溶液を得た。得られた乾燥反応溶液から、乾燥剤を濾去して減圧濃縮し、濃縮残渣を分取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム/アセトン=3/1) で精製し、化合物 12 (収量 228 mg、収率 99%) を白色固体として得た。

【0125】

上記化合物 12 の ESI-MS (positive) 測定を行ったところ m/z 1009.5 [(M+H)⁺] であった。また、¹H-NMR (400 MHz, CD₃Cl) 測定を行ったところ、また、¹H-NMR (400 MHz, CD₃Cl) 測定を行ったところ、 δ =8.75 (3H, s), 7.67 (3H, s), 7.30-6.95 (18H, m), 6.52 (1H, bs), 5.04 (2H, s), 3.71 (2H, d, J=5.0 Hz), 2.23 (6H, m), 1.97 (6H, m), 1.47 (27H, s) であった。これらにより、化合物 12 の構造を確認することができた。

【0126】

また、化合物 13 は、具体的には次のようにして得た。すなわち、化合物 12 (200 mg, 198 μ mol) をメタノール (3 mL) に溶解し、1.0% Pd/C (62.3 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 15 時間攪拌した後、上記 Pd/C を濾去して、減圧濃縮を行った。該減圧濃縮によって得られた濃縮残渣を分取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム/メタノール=8/1) で精製して、化合物 13 (収量 136 mg、収率 78%) を白色固体として得た。

【0127】

上記化合物 13 の ESI-MS (positive) 測定を行ったところ、 m/z 875.5 [(M+H)⁺] であった。これにより、化合物 13 の構造を確認することができた。

【0128】

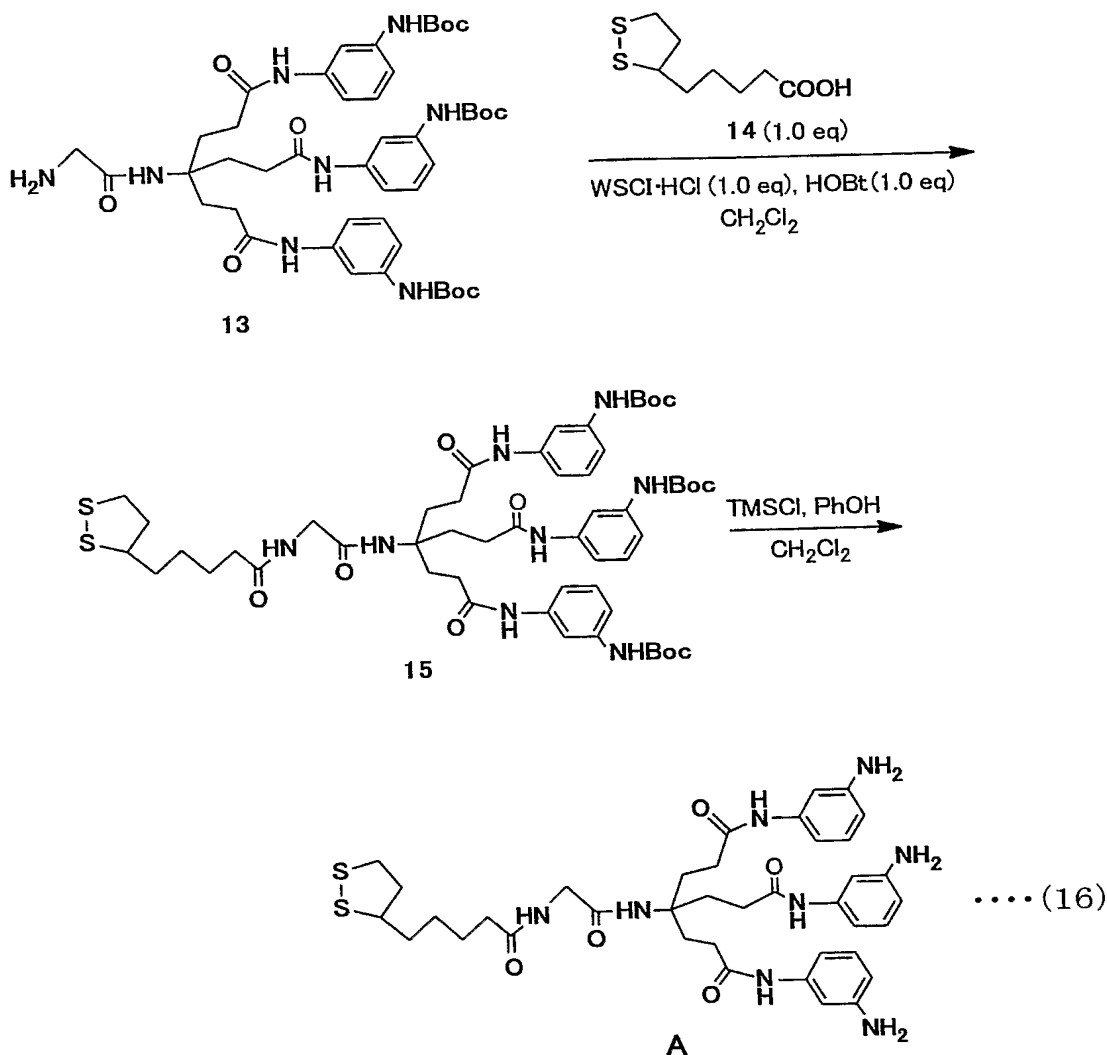
さらに、下記一般式 (16) にて示すように、1.0 当量の WSCI·HCl、1.0 当量の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (一般式 (16) 中、HOBT)、CH₂Cl₂ 中、上記化合物 13 を、1.0 当量のチオクト酸 (化合物 14) と縮合させ、収率 75% にてチオクト酸誘導体 (化合物 15) を得た。

【0129】

上記にて得られた化合物 15 を、CH₂Cl₂ 中、トリメチルシリルクロリド (式中、TMSCl)、フェノール (PhOH) の存在する酸性条件下にて、上記 Boc 基を脱保護し、芳香族アミノ基を有する炭化水素誘導鎖を 3 鎖含んでなるリンカー化合物として、化合物 A を得た (収率 32% 以上)。

【0130】

【化18】



【0131】

具体的に、化合物 15、16 を得るために以下の操作を行った。

【0132】

すなわち、化合物 15 を得るために、化合物 14 (23.6 mg, 114 μmol) と HOBt (15.4 mg, 114 μmol) を無水ジクロロメタン (2.3 mL) に溶解し、0℃の温度条件下、化合物 13 (2.50 mg, 6.02 μmol) を加えて、アルゴン雰囲気下で、遮光して室温で36時間攪拌した後、10%クエン酸水溶液とを加えてからクロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥剤として無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。その後、該乾燥剤を濾去して減圧濃縮し、濃縮残渣を分取シリカゲルクロマトグラフィ (溶媒: クロロホルム/メタノール=40/1) で精製して、化合物 15 (収量 91.0 mg、収率 75%) を白色固体として得た。

【0133】

上記化合物 15 の ESI-MS (positive) 測定を行ったところ、 m/z 1085.5 [(M+H)⁺] であった。また、¹H-NMR (400 MHz, CD₃Cl) 測定を行ったところ、 δ =9.01 (3H, bs), 7.67 (3H, s), 7.31 (1H, bs), 7.27-7.00 (12H, m), 3.71 (2H, bs), 3.64-3.39 (1H, m), 3.12-2.99 (2H, m), 2.33 (1H, m), 2.32 (6H, m), 2.20 (2H, m), 2.04 (6H, m), 1.82-1.73 (1H, m), 1.62-1.47 (4H, m), 1.47 (27H, s), 1.39-1.25 (2H, m) であった。これらにより、化合物 15 の構造を確認することができた。

【0134】

また、化合物Aを得るために、トリメチルシリルクロリド (0.25 mL, 2.64 mmol) をジクロロメタン (0.49 mL) に溶解し、フェノール (549 mg, 5.83 mmol) をジクロロメタン (1.46 mL) に溶解したフェノール溶液を加えて攪拌した後、さらに、化合物15 (34.7 mg, 32.6 μ mol) を加え、室温で、遮光した下1.5時間攪拌して、化合物15反応溶液を得た。続いて、該化合物15反応溶液にクロロホルムを加え、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄して、黄色固体を析出させた。析出した黄色固体を酢酸に溶解して4℃まで冷却し、凝集した固体を濾別して、化合物A (収量7.9 mg、収率32%) を白色固体として得た。

【0135】

上記化合物AのESI-MS (positive) 測定を行ったところ、 m/z 763.6 $[(M+H)^+]$ であった。また、 1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) 測定を行ったところ、 δ = 9.57 (3H, s), 7.97 (1H, m), 6.87 (6H, m), 6.67 (3H, d, J = 7.7 Hz), 6.21 (3H, d, J = 7.7 Hz), 4.98 (6H, bs), 3.67 (2H, d, J = 5.1 Hz), 3.56 (1H, m), 3.16-3.04 (2H, m), 2.36 (1H, m), 2.25 (6H, m), 2.19-2.07 (2H, m), 1.93 (6H, m), 1.83 (1H, m), 1.50 (4H, m), 1.33 (2H, m)であった。これらにより、化合物Aの構造を確認することができた。

【0136】

続いて、上記の合成方法で得られたリンカー化合物Aを用いて、上記一般式(8)にて表される構造において、 n が1であり、 X が一般式(2)にて表され、 m^1 , m^2 , m^3 が2である構造を有するリガンド(化合物1)を以下の手順にて合成した(図1(a)参照)。

【0137】

図1(a)に示すように、上記の方法で得られたリンカー化合物Aと、上記一般式(12)にて表されるオリゴ糖である市販のマルトース水和物(4.5当量)とを、 H_2O /ジメチルアセトアミド(式中、DMAc)/酢酸(AcOH) = 1/1/0.1の混合溶媒に溶解し、pH 4~4.5、37℃にて、シッフ塩基を形成させた後、溶媒をAcOHに変え、pH 3~4.5、37℃にて、10当量の95% $NaBH_3CN$ を加えて還元アミノ化反応を行った。その後、得られた化合物をSephadex G-50(アマーシャムバイオシステムズ社製)を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィにより精製し、さらに脱塩処理を行って、末端に α -グルコピラノースを3単位含んでなるリガンドとして化合物1を得た。上記化合物1の同定は、MALDI-TOF/MSおよびNMRによって行った。

【0138】

MALDI-TOF/MSの結果は、 m/z ; 1764.41 $[(M+Na)^+]$ であった。なお、得られるべき化合物1の質量は1740.70ダルトン(dalton)である。この結果とNMRの結果とから化合物1の構造を確認することができた。

【0139】

(2) 2番目のリガンドの合成

上記2番目のリガンドの一つである、上記一般式(8)にて表される構造において、 n が1であり、 X が一般式(3)にて表され、 m^1 , m^2 , m^3 が2である構造を有するリガンド(図1に示す化合物2)を以下の手順で合成した。

【0140】

上記リガンド(化合物2)の合成においては、まず、リンカー化合物Aを、上述の1番目のリガンドの合成における手順と同じ手順で合成した。

【0141】

続いて、得られたリンカー化合物Aを用いて、上記一般式(8)にて表される構造において、 n が1であり、 X が一般式(3)にて表され、 m^1 , m^2 , m^3 が2である構造を有するリガンド(化合物2)を以下の手順にて合成した(図1(b)参照)。

【0142】

図1(b)に示すように、上記の方法で得られたリンカー化合物Aと、上記一般式(13)にて表されるオリゴ糖である市販のラクトース水和物(4.5当量)とを、 H_2O /

ジメチルアセトアミド(式中、DMAc)/酢酸(AcOH)=1/1/0.1の混合溶媒に溶解し、pH4~4.5、37℃にて、シッフ塩基を形成させた後、溶媒をAcOHに変え、pH3~4.5、37℃にて、10当量の95%NaBH₃CNを加えて還元アミノ化反応を行った。その後、得られた化合物をSephadex G-50(アマーシャムバイオシステムズ社製)を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィにより精製し、さらに脱塩処理を行って、末端にβ-ガラクトピラノースを3単位含んでなるリガンドとして化合物2を得た。上記化合物2の同定は、MALDI-TOF/MSおよびNMRによって行った。

【0143】

MALDI-TOF/MSの結果は、 m/z ; 1766.92[(M+Na)⁺]であった。なお、得られるべき化合物2の質量は1740.70ダルトン(dalton)である。この結果とNMRの結果とから化合物2の構造を確認することができた。

【0144】

(3) 3番目のリガンドの合成

上記3番目のリガンドの一つである、上記一般式(8)にて表される構造において、nが1であり、Xが一般式(4)にて表され、 m^4 、 m^5 が2である構造を有するリガンド(図2に示す化合物3)を以下の手順で合成した。

【0145】

上記リガンド(化合物3)の合成の前段階として、まず、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を2鎖有するリンカー化合物(図2に示す化合物B)の合成を行った。このリンカー化合物Bの合成は、上述のリンカー化合物Aの合成方法および上記特許文献1に記載の各種化合物の合成方法を参考にすれば当業者が実施することが可能であるので、ここではその説明を省略する。

【0146】

続いて、得られたリンカー化合物Bを用いて、上記一般式(8)にて表される構造において、nが1であり、Xが一般式(4)にて表され、 m^4 、 m^5 が2である構造を有するリガンド(化合物3)を以下の手順にて合成した(図2(a)参照)。

【0147】

図2(a)に示すように、上記の方法で得られたリンカー化合物Bと、上記一般式(12)にて表されるオリゴ糖である市販のマルトース水和物(4.5当量)とを、H₂O/ジメチルアセトアミド(式中、DMAc)/酢酸(AcOH)=1/1/0.1の混合溶媒に溶解し、pH4~4.5、37℃にて、シッフ塩基を形成させた後、溶媒をAcOHに変え、pH3~4.5、37℃にて、10当量の95%NaBH₃CNを加えて還元アミノ化反応を行った。その後、得られた化合物をSephadex G-50(アマーシャムバイオシステムズ社製)を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィにより精製し、さらに脱塩処理を行って、末端にα-グルコピラノースを2単位含んでなるリガンドとして化合物3を得た。上記化合物3の同定は、MALDI-TOF/MSおよびNMRによって行った。

【0148】

MALDI-TOF/MSの結果は、 m/z ; 1239.36[(M+Na)⁺]であった。なお、得られるべき化合物3の質量は1238.48ダルトン(dalton)である。この結果とNMRの結果とから化合物3の構造を確認することができた。

【0149】

(4) 4番目のリガンドの合成

上記4番目のリガンドの一つである、上記一般式(8)にて表される構造において、nが1であり、Xが一般式(5)にて表され、 m^4 、 m^5 が2である構造を有するリガンド(図2に示す化合物4)を以下の手順で合成した。

【0150】

上記リガンド(化合物4)の合成の前段階として、まず、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を2鎖有するリンカー化合物(図2に示す化合物B)の合成を行った。このリンカー化合物Bの合成は、上述のリンカー化合物Aの合成方法および上記特許文献1に記載の各種化合物の合成方法を参考にすれば当業者が実施することが可能で

あるので、ここではその説明を省略する。

【0151】

続いて、得られたリンカー化合物Bを用いて、上記一般式(8)にて表される構造において、 n が1であり、 X が一般式(5)にて表され、 m^4 、 m^5 が2である構造を有するリガンド(化合物4)を以下の手順にて合成した(図2(b)参照)。

【0152】

図2(b)に示すように、上記の方法で得られたリンカー化合物Bと、上記一般式(13)にて表されるオリゴ糖である市販のラクトース水和物(4.5当量)とを、 H_2O /ジメチルアセトアミド(式中、DMAc)/酢酸(AcOH)=1/1/0.1の混合溶媒に溶解し、 pH 4~4.5、37℃にて、シッフ塩基を形成させた後、溶媒をAcOHに変え、 pH 3~4.5、37℃にて、10当量の95%NaBH₃CNを加えて還元アミノ化反応を行った。その後、得られた化合物をSephadex G-50(アマーシャムバイオシステムズ社製)を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、さらに脱塩処理を行って、末端に β -ガラクトピラノースを2単位含んでなるリガンドとして化合物4を得た。上記化合物4の同定は、MALDI-TOF/MSおよびNMRによって行った。

【0153】

MALDI-TOF/MSの結果は、 m/z ; 1261.15[(M+Na)⁺]であった。なお、得られるべき化合物4の質量は1238.48ダルトン(dalton)である。この結果とNMRの結果とから化合物4の構造を確認することができた。

【0154】

[実施例2: SPR測定と質量分析によるタンパク質の分析]

実施例2では、実施例1にて作製した各リガンド(化合物1~4)を用いて、タンパク質の糖鎖との結合特性について、SPR測定および質量分析によって解析した。その手順について以下に説明する。

【0155】

図3には、本実施例におけるタンパク質の分析の手順を工程1~工程12として示す。図3において、工程1~工程7は、各リガンド(化合物1~4)を、金(Au)でコーティングされた支持体表面に固定化させてリガンド担持体(センサチップ)を作製する工程である。そして、上記リガンド担持体を、分析対象となるタンパク質を含む溶液と接触させる工程8の後に実施される工程が、SPR測定を行う工程である。さらに、支持体表面を水で洗う工程10の後に実施される工程が、質量分析(MS)によってタンパク質を同定する工程である。

【0156】

本実施例において、SPR測定は日本レーザ電子社製のSPR-8Bを用いて行った。また、質量分析はアプライドバイオ社製のマトリックス支援型レーザ脱離/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF/MS): Voyager RP-DEを用いて行った。

【0157】

分析に用いたタンパク質は、グルコピラノース結合性のレクチンタンパク質: ConA, PSA, LCA、および、ガラクトピラノース結合性のレクチンタンパク質: RCA, PNAの5種類であった。そして、ネガティブコントロールとしてウシ血清アルブミン: BSAを用いた。

【0158】

まず、図3に示す工程1~工程7に基づいて、上記化合物1~4をそれぞれ固定化した4種類のリガンド担持体を作製した。続いて、上記の5種のレクチンタンパク質およびBSAを、それぞれPBSバッファに溶解してタンパク質溶液を調整した。その後、図3に示す工程8を行い、各リガンド担持体と各タンパク質溶液とをそれぞれ接触させて相互作用させた。続いて、SPR測定を行い、リガンド担持体とタンパク質との結合測定を行った。その結果を下記の表1に示す。なお、表1において、+は結合が確認されたもの、-は結合が確認されなかったものを示している。また、表1において括弧内に示すものは、PBSバッファに2mM EDTAを追加した場合の結果を示す。

【0159】

【表1】

タンパク質	リガンドの種類			
	化合物1	化合物2	化合物3	化合物4
ConA	+(+)	—	+(+)	—
RCA	—	+	—	+(+)
PSA	+	—	+	—
PNA	—	+	—	+
LCA	+	—	—	—
BSA (ネガティブ コントロール)	—	—	—	—

【0160】

表1に示すように、ほとんどのレクチンタンパク質は、報告されているとおりの糖鎖結合特異性を有することが確認された。しかしながら、グルコピラノース結合性のレクチンタンパク質と報告されているLCAについては、一つのリガンドにつき3単位の糖分子を有する化合物1とは結合することが示されたが、一つのリガンドにつき2単位の糖分子を有する化合物3とは結合しないことが確認された。この結果から、糖鎖の集合化度によってタンパク質の糖鎖に対する結合活性が異なることが確認された。

【0161】

さらに、このSPR測定に供したリガンド担持体のうち、タンパク質との結合が確認されたものについては、工程9および工程10を行った後、質量分析計に供することで、リガンド担持体に結合しているタンパク質の同定を行った。なお、質量分析を行う際には、結合測定を行った部分にマトリックス溶液（飽和 α CHCAまたはシナピン酸）を乗せ、乾燥させてから質量分析計に供し、分子質量の測定を行った。

【0162】

上記の一連の工程で、リガンド担持体とタンパク質との結合挙動を確認した後、工程11においてリガンド担持体とタンパク質との結合を解離させた後、工程12においてPBSバッファーで洗浄を行った。その後、別のタンパク質溶液を用いて、再度工程7～工程10までを繰り返し、SPR測定および質量分析を行った。この作業を各リガンド担持体および各タンパク質について繰り返し実施した。

【0163】

この質量分析の結果、結合した各々のレクチンタンパク質に相当する分子量が観測され、全てのレクチンタンパク質の同定に成功した。

【0164】

以上のように、本実施例の結果から、本発明にかかるリガンドを用いてSPR測定および質量分析を行ってタンパク質の分析を行えば、タンパク質を正確に同定することができることが確認された。また、本実施例の結果から、末端に同じ糖鎖を有しているリガンド担持体であっても、糖鎖の集合化度の差によってタンパク質との結合活性が異なることが確認された。つまり、本発明のタンパク質の分析方法は、糖鎖の集合化度とタンパク質の結合活性との関係の解析にも利用できると考えられる。このような糖鎖の集合化度とタンパク質の結合活性との関係の解析は、既存の方法では判別不可能であるため、本発明の有用性をより高めるものと言える。

【産業上の利用可能性】

【0165】

本発明は、タンパク質の機能解析に有効利用することのできる新規なリガンドやリガン

ド担持体などを提供するものである。オリゴ糖鎖を固定化したリガンド担持体（チップ）が糖鎖やタンパク質の機能解析のツールとして発展すれば、オリゴ糖鎖が関与する生命現象の解明に貢献するだけでなく、医薬品開発における重要な技術となることが期待される。それゆえ、本発明の有用性は高いと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0166】

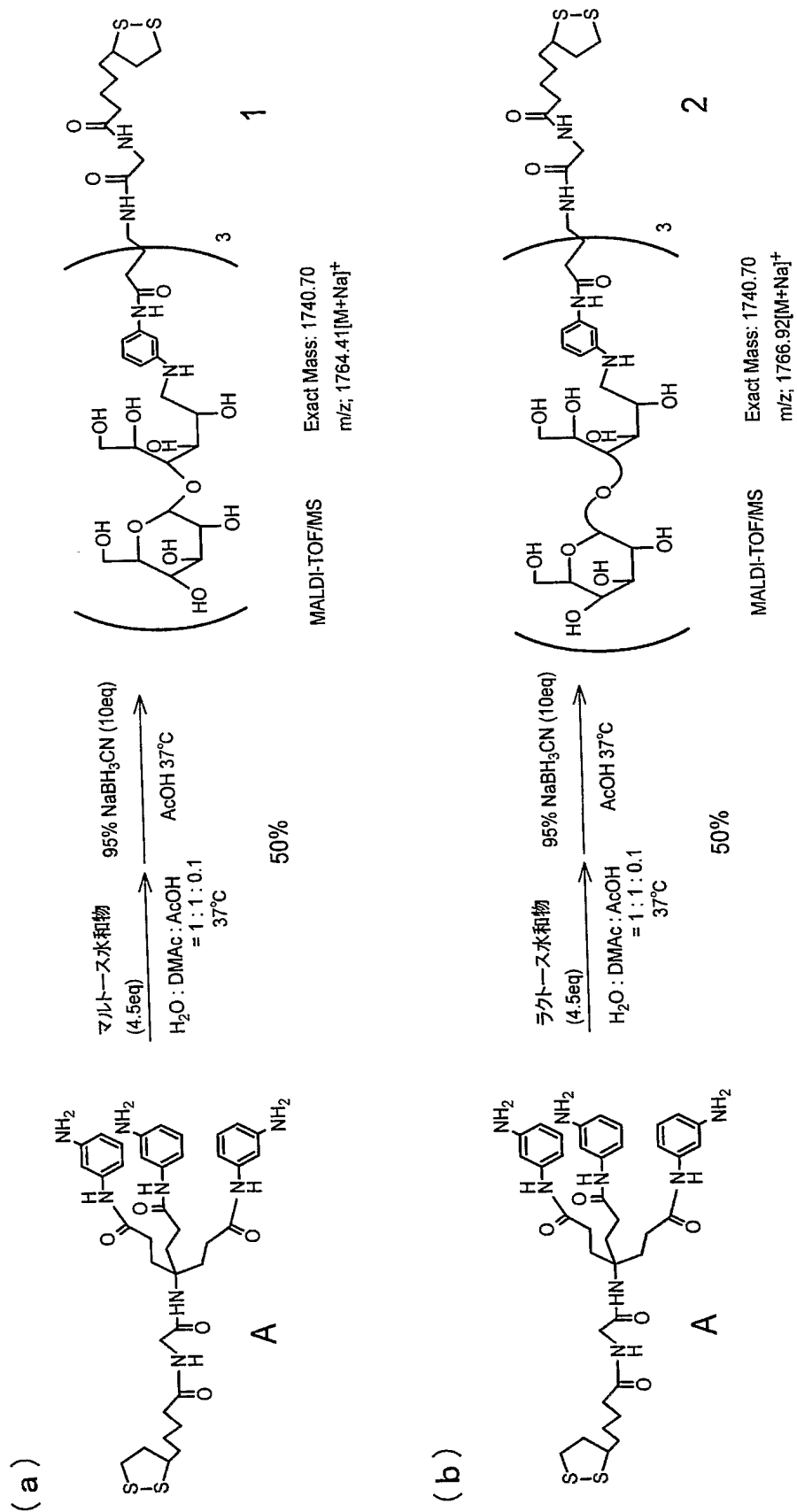
【図1】 3鎖の炭化水素誘導鎖からリンカー化合物から本発明のリガンドを合成する合成経路の一例を示す模式図である。なお、（a）に示す合成経路は化合物1の合成経路であり、（b）に示す合成経路は化合物2の合成経路である。

【図2】 2鎖の炭化水素誘導鎖を有するリンカー化合物から本発明のリガンドを合成する合成経路の一例を示す模式図である。なお、（a）に示す合成経路は化合物3の合成経路であり、（b）に示す合成経路は化合物4の合成経路である。

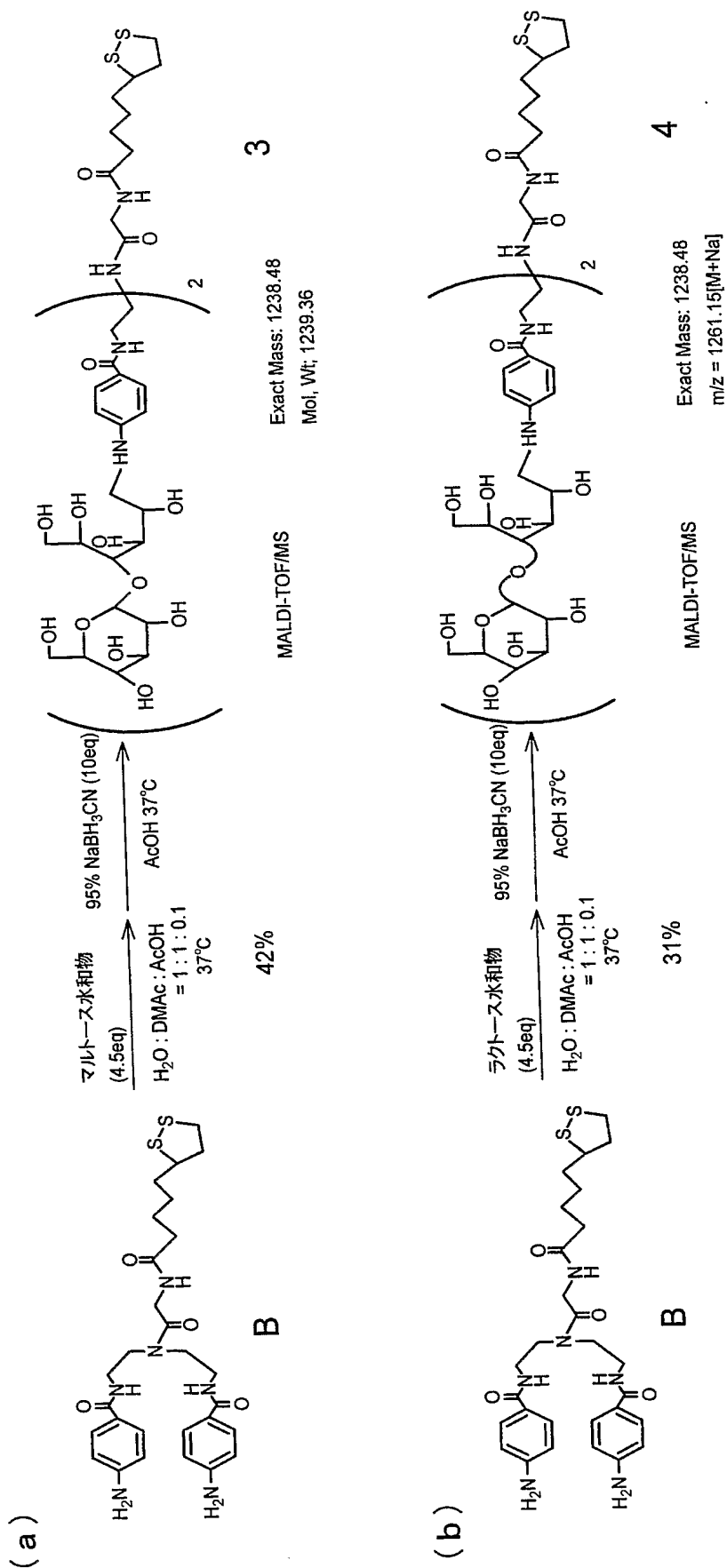
【図3】 本発明のリガンドを用いたタンパク質分析方法の手順を示す模式図である。

【書類名】 図面

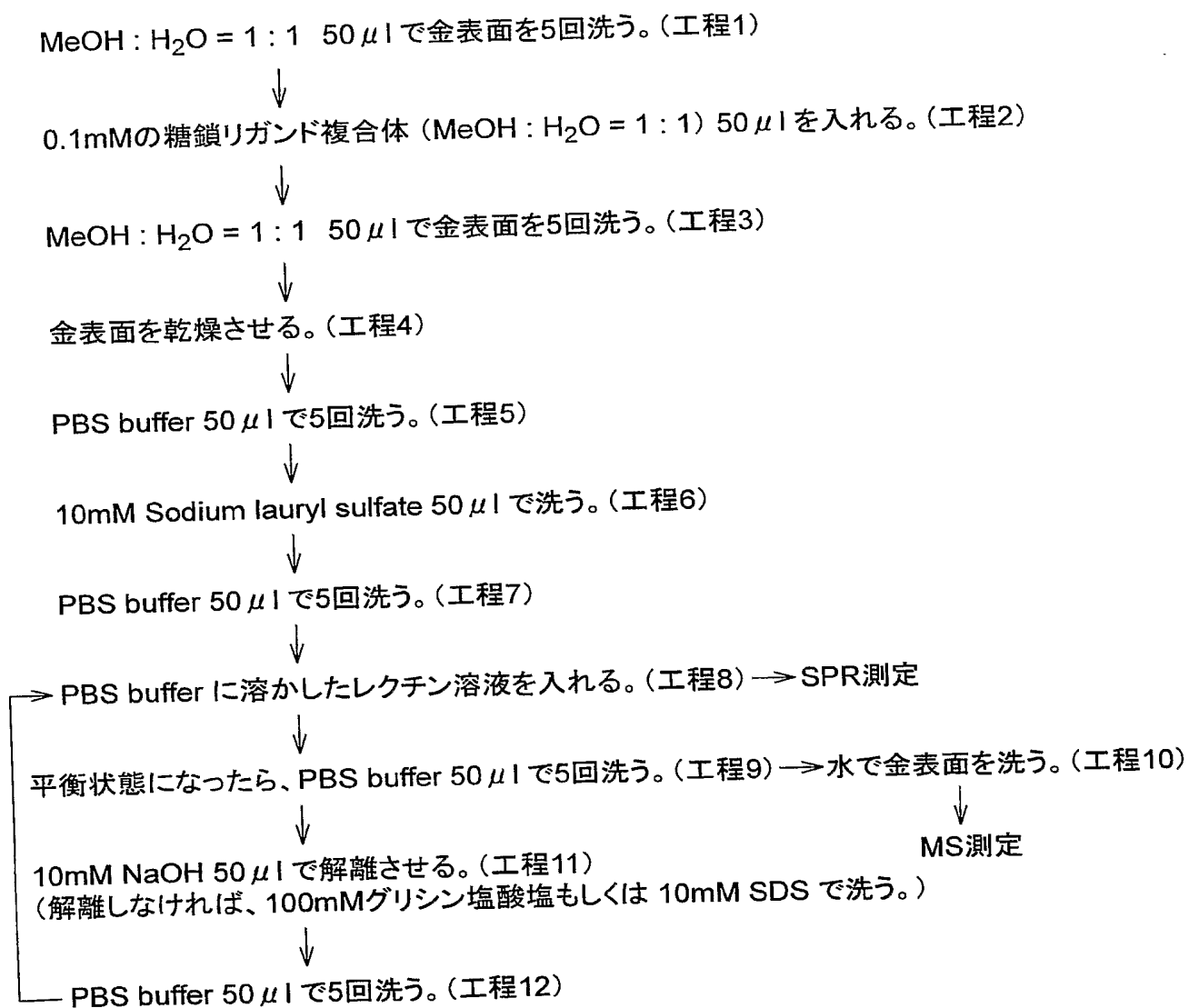
【図1】



【図 2】



【図 3】



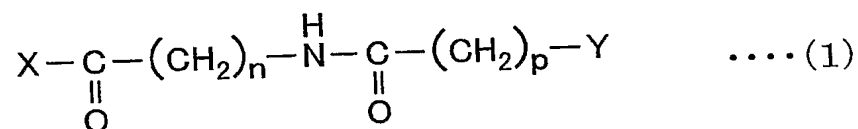
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質の機能解析に有効利用することのできる新規なリガンド、リガンド担持体、および、タンパク質の分析方法を提供する。

【解決手段】 リガンドは、下記一般式(1)

【化1】



(式中、n, pは1以上6以下の整数)にて表される構造を備えている。上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに、主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、2鎖又は3鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備え、上記Yとして、硫黄原子を含む炭化水素構造を備えているリンカー化合物と、還元末端を有する糖とが、上記芳香族アミノ基を介して結合している構造である。また、上記Yは、S-S結合またはSH基を含む炭化水素構造である。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【整理番号】 VP16041994
【提出日】 平成16年 7月 6日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2004- 41994
【承継人】
【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号
【氏名又は名称】 国立大学法人鹿児島大学
【承継人代理人】
【識別番号】 100080034
【弁理士】
【氏名又は名称】 原 謙三
【電話番号】 06-6351-4384
【その他】 15 文科会第1999号に基づく承継

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-041994
受付番号	50401138756
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成16年 8月 9日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	504258527
【住所又は居所】	鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
【氏名又は名称】	国立大学法人 鹿児島大学

【承継人代理人】

申請人	申請人
【識別番号】	100080034
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和 南森町ビル 原謙三国際特許事務所
【氏名又は名称】	原 謙三

特願 2004-041994

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人科学技術振興機構

特願 2 0 0 4 - 0 4 1 9 9 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 1 0 1 2 5 2 3]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 1 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

鹿児島県鹿児島市郡元 1 丁目 2 1 番 2 4 号

氏 名

鹿児島大学長

特願 2 0 0 4 - 0 4 1 9 9 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 2 5 8 5 2 7]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 7 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号

氏 名

国立大学法人 鹿児島大学